

Bescheinigung

PRIORITY DOCUMENT

Die Hoechst Schering AgrEvo GmbH in 13509 Berlin hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Verfahren zur Inhibierung der Blütenbildung
in Pflanzen"

am 22. September 1994 beim Deutschen Patentamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patentamt vorläufig die Symbole A 01 H 5/00, A 01 H 1/06, C 12 N 15/82, C 12 N 15/70, C 12 N 15/74, C 12 N 15/60 und C 12 N 1/21 der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 8. März 1995

Der Präsident des Deutschen Patentamts

Im Auftrag

Röske

Aktenzeichen: P 44 35 366.9

Verfahren zur Inhibierung der Blütenbildung in Pflanzen

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Inhibierung der Blütenbildung in Pflanzen sowie DNA-Sequenzen und neue Plasmide, enthaltend diese DNA-Sequenzen, die bei Integration in ein pflanzliches Genom die Aktivität der Citrat-Synthase in der Pflanze verändern. Ferner betrifft die Erfindung transgene Pflanzen, bei denen durch Einführung dieser DNA-Sequenzen Veränderungen der Aktivität der Citrat-Synthase hervorgerufen werden.

Bedingt durch den kontinuierlich steigenden Nahrungsmittelbedarf, der aus der ständig wachsenden Weltbevölkerung resultiert, ist eine der Aufgaben der biotechnologischen Forschung, sich um eine Steigerung des Ertrages von Nutzpflanzen zu bemühen. Eine Möglichkeit dies zu erreichen, besteht in der Veränderung des Metabolismus der Pflanzen.

Das Wachstum, die Entwicklung und der Ertrag einer Nutzpflanze hängt von der Energie ab, die diese Pflanze durch Bildung von Kohlenhydraten während der Photosynthese gewinnt. Die primären Orte für die Photosynthese sind das Blatt und zu einem geringen Ausmaß das Stammgewebe. Andere Organe der Pflanze, wie Wurzeln, Samen und Knollen tragen nicht wesentlich zur Produktion von Photoassimilaten bei, sondern sind im Gegenteil in ihrem Wachstum von der Versorgung durch photosynthetisch aktive Organe abhängig. Die photosynthetisch aktiven Gewebe werden als Quellen oder "sources" bezeichnet. Sie werden als Nettoexporteure des während der Photosynthese fixierten CO_2 definiert. Die photosynthetisch inaktiven Teile der Pflanze werden als Senken oder "sinks" bezeichnet. Sie werden als Nettoimporteure des photosynthetisch fixierten Kohlendioxids definiert.

Die Samen einer Pflanze beispielsweise sind völlig von der Photosyntheseleistung der "sources" abhängig, d.h. von der Verteilung der in den "sources" gebildeten Photoassimilate. Ein Eingriff in den Metabolismus einer Pflanze, der die Verteilung der Photoassimilate verändert, kann daher von ganz entscheidender Bedeutung für den Ertrag einer Pflanze sein.

Im Fall der Kartoffel ist es beispielsweise wünschenswert, den Metabolismus der Pflanze dahingehend zu verändern, daß es zu einem möglichst effizienten Transport der Photoassimilate in die Speicherorgane, die Knollen, und zu einer möglichst maximalen Synthese von Stärke in den Knollen kommt.

Da die Vermehrung der Kartoffelpflanzen für landwirtschaftliche Zwecke in erster Linie vegetativ über Kartoffelknollen und nicht über Samen erfolgt, ist die Bildung von Blüten, d.h. potentiellen "sinks", die mit den Knollen um die gebildeten Photoassimilate konkurrieren, bei Kartoffelpflanzen, die lediglich für die Bereitstellung von Kartoffelknollen zur Stärkeproduktion vorgesehen sind, nicht notwendig.

Eine gezielte Inhibierung der Blütenbildung ist jedoch bei den meisten Pflanzen bisher nicht möglich, da der Prozeß der Induktion der Blütenbildung bei Pflanzen insgesamt noch nicht sehr gut verstanden ist. Als Induktoren der Blütenbildung werden verschiedene Substanzen wie z.B. Kohlenhydrate, Cytokinine, Auxin, Polyamine und Calcium diskutiert. Insgesamt ergibt sich aber der Eindruck, daß es sich bei der Blühinduktion um einen komplexen Vorgang handelt, bei dem mehrere bisher noch nicht eindeutig identifizierte Faktoren zusammenwirken (Bernier et al. (1993) Plant Cell 5:1147-1155).

Die Inhibierung der Blütenbildung bei Zuckerrohr, die zu einer erheblichen Steigerung des Zuckerertrages führt, ist möglich durch die exogene Applikation verschiedener synthetischer Wachstumsregulatoren (Monuron, Diuron, Diquat). Doch auch wenn durch den Einsatz derartiger synthetischer Wachstumsregulatoren die gewünschte-Ertragssteigerung erreicht werden kann, so ist doch eine sorgfältige Abwägung von Nutzen und Schaden bei der Verwendung derartiger synthetischer Stoffe angeraten. Neben den sehr hohen Kosten, die meistens mit der Anwendung synthetischer Stoffe verbunden sind, gilt es insbesondere, die Auswirkungen auf die Umwelt durch biologisch nicht abbaubare oder nur bedingt abbaubare Stoffe zu berücksichtigen. Da in der Regel nur unzureichendes Wissen über die Umweltverträglichkeit vieler synthetischer Wachstumsregulatoren besteht, bringt eine umfangreiche Anwendung dieser Substanzen in der Landwirtschaft immer ein erhebliches Risiko bezüglich der Langzeitwirkung auf die Umwelt mit sich.

Es erscheint daher wünschenswert, Verfahren zur Verfügung zu stellen, die eine gezielte Inhibition der Blütenbildung bei verschiedenen Nutzpflanzen unter Vermeidung der Anwendung synthetischer Substanzen erlauben.

Die vorliegende Erfindung beschreibt ein Verfahren, bei der es aufgrund einer Veränderung der Aktivität eines Enzyms, das an respiratorischen Prozessen in den Zellen beteiligt ist, zu einer Veränderung des Blühverhaltens derartig veränderter Pflanzen führt.

Respiratorische Prozesse spielen wie in Tieren auch in Pflanzen eine essentielle Rolle bei der Versorgung der Zellen mit Energie zur Aufrechterhaltung ihres Metabolismus. Hierbei werden durch den Abbau organischer Substrate (Zucker, Fette oder Proteine), in dessen Verlauf Wasserstoff auf molekularen Sauerstoff übertragen wird, energiereiche Verbindungen, in erster Linie ATP, hergestellt. Diese können anschließend für biosynthetische Prozesse im Rahmen von Wachstums- und Entwicklungsprozessen verwendet werden.

Eine zentrale Rolle bei dem Abbau von Kohlenhydraten, Fettsäuren und Aminosäuren sowie bei der Bereitstellung von Ausgangssubstanzen für viele Biosynthesereaktionen spielt in pflanzlichen wie in tierischen Zellen der Tricarbonsäure-Zyklus (TCA-Zyklus, Zitronensäure-Zyklus, Krebs-Zyklus), der in den Mitochondrien der Zellen abläuft.

In diesen Zyklus wird das Zwischenprodukt Acetyl-CoenzymA, das sowohl beim Abbau von Kohlenhydraten über die Glykolyse, als auch beim Abbau von Fettsäuren durch die β -Oxidation entsteht, eingeschleust und im Verlauf des Zyklus in Kohlendioxid und reduzierte Coenzyme (NADH, FADH_2) umgewandelt.

Das Enzym, das für den Eintritt des Acetyl-CoAs in den TCA-Zyklus verantwortlich ist, ist die Citrat-Synthase (EC-Nr. 4.1.3.7.). Dieses Enzym katalysiert die Aldolkondensation von Acetyl-CoenzymA und Oxalacetat zu Citrat unter Freisetzung von reduziertem CoenzymA. Die Citrat-Synthase nimmt innerhalb des Stoffwechsels eine zentrale Stellung ein, da die von diesem Enzym katalysierte Reaktion essentiell ist für die Einschleusung des Substrats Acetyl-CoenzymA

in den Citrat-Zyklus. Entsprechend der Schlüsselstellung, die dieses Enzym im Metabolismus der Zelle einnimmt, wird seine Aktivität in vielfältiger und komplexer Art und Weise reguliert.

Untersuchungen zu Struktur und Funktion der Citrat-Synthase fanden bisher schwerpunktmäßig bei Prokaryonten, Pilzen und Tieren statt. So sind beispielsweise bereits bei einer Reihe von Prokaryonten Gene beschrieben, die für Citrat-Synthase kodieren, z.B. bei *E.coli*, *Acinetobacter anitratum*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Rickettsia prowazekii*, *Bacillus* sp. (Schendel et al. (1992) Appl. Environ. Microbiol. 58:335-345 und Referenzen darin), *Coxiella burnetii* (Heinzen et al. (1991) Gene 109:63-69) und *Haloferax volcanii* (James et al. (1992) Biochem. Soc. Trans. 20:12). Ebenso sind bereits bei *Saccharomyces cerevisiae* (Suissa et al. (1984) EMBO J. 3:1773-1781) und *Neurospora crassa* (Ferea et al. (1994), Mol. Gen. Genet. 242:105-110) derartige Gene bekannt. Bei Tieren ist lediglich das Gen für die Citrat-Synthase aus Schwein bekannt (Bloxham et al. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. 78:5381-5385).

Pflanzliche Citrat-Synthasen sind bisher nur in sehr geringem Umfang untersucht worden. Lediglich in wenigen Fällen wurde das Enzym angereinigt, z.B. aus Blättern von *Pisum sativum* (Unger und Vasconcelos (1989) Plant Physiol. 89:719-723) oder Ricinus-Sämlingen (Kagawa und Gonzalez (1981) Plant Physiol. 68:845-850). Und nur in einem einzigen Fall, bei *Arabidopsis thaliana*, wurde bisher eine cDNA-Sequenz isoliert, die für eine pflanzliche Citrat-Synthase kodiert (Unger et al. (1989) Plant Mol. Biol. 13:411-418).

Angeichts der Bedeutung der Citrat-Synthase für den Metabolismus der Zelle ist fraglich, ob Pflanzen eine Reduktion oder Steigerung der -Citrat-Synthaseaktivität in allen oder in bestimmten Organen tolerieren. Insbesondere ist nicht bekannt, ob es möglich ist, transgene Pflanzen mit einer reduzierten Citrat-Synthaseaktivität herzustellen. Für die Herstellung von Pflanzen mit reduzierter Citrat-Synthaseaktivität ist es notwendig, Citrat-Synthase-Kodierregionen solcher Pflanzenspezies zur Verfügung zu stellen, mit denen transgene Pflanzen in großer Anzahl erzeugt werden können. Pflanzenspezies, die dieser Anforderung gerecht werden, sind beispielsweise *Solanum tuberosum* und *Nicotiana tabacum*. Die genetische Veränderung von *Solanum tuberosum* durch Agrobakterien vermittelten Gentransfer ist ausreichend beschrieben (Fraley et al. (1985) Crit. Rev. Plant. Sci. 4:1-46). Ebenso

ist die genetische Veränderung von Tabak mit Hilfe gentechnischer Methoden beschrieben.

Es wurde nun überraschend gefunden, daß eine starke Inhibierung der Citrat-Synthaseaktivität in Kartoffelpflanzen zu einer vollständigen Inhibierung der Blütenbildung bei diesen Pflanzen führt (Fig. 8).

Des weiteren wurde gefunden, daß eine Inhibierung der Citrat-Synthaseaktivität in Kartoffelpflanzen zu stark verringerten Lagerungsverlusten bei der Lagerung von Kartoffelknollen sowie einer Veränderung des Keimungsverhaltens der Knollen führt.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit ein Verfahren zur Inhibierung der Blütenbildung in Pflanzen sowie ein Verfahren zur Verbesserung der Speicherkapazität von Nutzpflanzen, beide dadurch gekennzeichnet, daß die Expression endogener Citrat-Synthasegene gehemmt wird.

Besonders bevorzugt sind in beiden Fällen Verfahren, in denen die Inhibierung der Blütenbildung bzw. die Verbesserung der Speicherkapazität dadurch erreicht wird, daß die Expression endogener Citrat-Synthasegene durch den Einsatz von anti-sense-DNA gehemmt wird.

Einen weiteren Gegenstand der Erfindung bilden die aus dem erfindungsgemäßen Verfahren resultierenden Pflanzen, die dadurch gekennzeichnet sind, daß sie eine veränderte Citrat-Synthase-Aktivität aufweisen.

Desweiteren sind Gegenstand der Erfindung DNA-Sequenzen aus Pflanzen der Familie der Solanacea, insbesondere der Spezies *Solanum tuberosum* (siehe Seq ID No. 1) und *Nicotiana tabacum* (siehe Seq ID No. 3), sowie der Familie der Chenopodiacea, insbesondere der Spezies *Beta vulgaris* (siehe Seq ID No. 2), die die kodierende Region für eine Citrat-Synthase enthalten, und die nach Integration in ein pflanzliches Genom und Expression zur Synthese einer nicht-translatierbaren RNA führen, durch die die Synthese endogener Citrat-Synthasen inhibiert werden kann, oder zur Synthese einer translatierbaren RNA führen, durch die die Citrat-Synthaseaktivität in den Zellen erhöht werden kann, sowie DNA-

Sequenzen, die für ein Protein mit einer der unter Seq ID No. 1, Seq ID No. 2 oder Seq ID No. 3 angegebenen Aminosäuresequenzen kodiert. Ebenfalls Gegenstand der Erfindung sind Plasmide und Bakterien enthaltend diese DNA-Sequenzen oder Teile oder Derivate davon.

Gegenstand der Erfindung ist weiterhin die Verwendung von DNA-Sequenzen aus Pflanzen, die für Citrat-Synthase kodieren, für die Inhibierung bzw. Induktion der Blütenbildung, sowie die Verwendung der erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen, insbesondere der DNA-Sequenzen aus *Solanum tuberosum*, *Nicotiana tabacum* und *Beta vulgaris*, in Kombination mit Steuerelementen zur Expression in pro- und eukaryontischen Zellen, die Verwendung zur Expression einer nichttranslatierbaren mRNA, die die Synthese endogener Citrat-Synthasen in den Zellen verhindert, sowie die Verwendung dieser DNA-Sequenzen zur Isolierung ähnlicher Sequenzen aus dem Genom von Pflanzen.

Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Inhibierung der Blütenbildung in Pflanzen sowie ein Verfahren zur Verbesserung der Speicherkapazität von Nutzpflanzen, beide dadurch gekennzeichnet, daß

- a) in das Genom einer Pflanzenzelle eine DNA stabil integriert wird, die komplementär zu einem in der Zelle vorhandenen Citrat-Synthasegen ist,
- b) diese DNA durch Kombination mit geeigneten, die Transkription steuernden Elementen konstitutiv oder induziert exprimiert wird,
- c) die Expression endogener Citratsynthase-Gene aufgrund eines anti-sense-Effektes gehemmt wird und
- d) aus den transgenen Zellen Pflanzen regeneriert werden.

Die Expression einer DNA, die komplementär zu einem in der Zelle vorhandenen Citrat-Synthasegen ist, wird in der Regel dadurch erreicht, daß ein DNA-Molekül umfassend eine Expressionskassette mit folgenden Bestandteilen in das Genom der Pflanzen integriert und exprimiert wird:

- A) einem in Pflanzen funktionalen Promotor,

B) einer für Citrat-Synthase kodierenden DNA-Sequenz, die in anti-sense Orientierung an den Promotor fusioniert ist, so daß der nicht-kodierende Strang abgelesen wird, und

C) einem in Pflanzen funktionalen Signal für die Transkriptionstermination und Polyadenylierung eines RNA-Moleküls.

Die vorliegende Erfindung stellt derartige DNA-Moleküle, die derartige Expressionskassetten enthalten, in Form des Plasmids pKS-CSa (DSM 8880), das die kodierende Region für Citrat-Synthase aus Kartoffeln umfaßt, und des Plasmids TCSAS (DSM 9359), das die kodierende Region von Citrat-Synthase aus Tabak umfaßt, zur Verfügung, deren Zusammensetzung in den Ausführungsbeispielen 3 bzw. 8 beschrieben ist.

Als Promotor kann im Prinzip jeder in Pflanzen aktive Promotor verwendet werden. Der Promotor soll sicherstellen, daß das gewählte Gen in der Pflanze exprimiert wird. Der Promotor kann dabei so gewählt werden, daß die Expression nur in einem bestimmten Gewebe, zu einem bestimmten Zeitpunkt in der Pflanzenentwicklung oder zu einem durch äußere Einflüsse determinierten Zeitpunkt erfolgt. Der Promotor kann homolog oder heterolog in bezug auf die Pflanze sein.

Der Einsatz gewebespezifischer Promotoren stellt einen bevorzugten Gegenstand der Erfindung dar.

Die vorliegende Erfindung stellt DNA-Sequenzen zur Verfügung, durch deren Verwendung Veränderungen der Citrat-Synthaseaktivität in Pflanzen, insbesondere in Kartoffelpflanzen und Tabakpflanzen, tatsächlich und nachweisbar möglich sind.

Es handelt sich dabei um Sequenzen mit der kodierenden Region von Citrat-Synthase aus *Solanum tuberosum*, *Nicotiana tabacum* und *Beta vulgaris*.

Eine bevorzugten Ausführungsform des oben angegebenen Verfahrens sieht vor, daß für die in Verfahrensschritt B) des oben angegebenen Verfahrens angeführte DNA-Sequenz eine DNA-Sequenz verwendet wird, die aus einer Pflanze der Familie der

Solanacea oder der Familie der *Chenopodiaceae* stammt und für eine Citrat-Synthase kodiert. Besonders bevorzugt werden DNA-Sequenzen verwendet, die für eine Citrat-Synthase aus *Solanum tuberosum* kodieren, vorzugsweise Sequenzen, die für ein Protein mit der unter Seq ID No. 1 angegebenen Aminosäuresequenz kodieren, insbesondere Sequenzen mit der unter Seq. ID No.1 angegebenen Nukleotidabfolge.

Nach der Einführung des Plasmids pKS-CSa (DSM 8880), das die kodierende Region für Citrat-Synthase aus Kartoffel in anti-sense Orientierung unter der Kontrolle des 35S-Promotors des CaMV umfaßt (siehe Ausführungsbeispiel 3) in das Genom einer Kartoffelpflanze kommt es zu einer starken Reduktion der Citrat-Synthase-Aktivität in den Zellen transformierter Pflanzen (siehe Fig. 7) und zur Inhibierung der Blütenbildung (siehe Fig. 8).

Eine weitere bevorzugten Ausführungsform des oben angegebenen Verfahrens sieht vor, daß für die in Verfahrensschritt B) des oben angegebenen Verfahrens angeführte DNA-Sequenz eine DNA-Sequenz verwendet wird, die für eine Citrat-Synthase aus *Nicotiana tabacum* kodiert, vorzugsweise eine Sequenz, die für ein Protein mit der unter Seq ID No. 3 angegebenen Aminosäuresequenz kodiert, und insbesondere eine Sequenz mit der weiter Seq. ID No. 3 angegebenen Nukleotidabfolge.

Eine weitere bevorzugte Ausführungsform des oben angegebenen Verfahrens sieht vor, daß für die in Verfahrensschritt B) des oben angegebenen Verfahrens angeführte DNA-Sequenz eine DNA-Sequenz verwendet wird, die für eine Citrat-Synthase aus *Beta vulgaris* kodiert, vorzugsweise eine Sequenz, die für ein Protein mit der unter Seq ID No. 2 angegebenen Aminosäuresequenz kodiert, und insbesondere eine Sequenz mit der weiter Seq. ID No. 2 angegebenen Nukleotidabfolge.

Die anti-sense Orientierung der in Schritt B) des Verfahrens genannten kodierenden DNA-Sequenz in bezug auf den Promotor bewirkt, daß in den transformierten pflanzlichen Zellen eine nicht-translatierbare mRNA gebildet wird, die die Synthese einer endogenen Citrat-Synthase verhindert.

Anstatt der gesamten unter Seq ID No. 1, Seq ID No. 2 und Seq ID No. 3 angegebenen erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen können auch Teilsequenzen davon für die anti-sense-Inhibition verwendet werden. Es können Sequenzen bis zu einer Mindestlänge von 15 bp verwendet werden. Eine inhibierende Wirkung ist aber auch bei der Verwendung kürzerer Sequenzen nicht ausgeschlossen. Bevorzugt werden längere Sequenzen zwischen 100 und 500 Basenpaaren verwendet, für eine effiziente anti-sense Inhibition werden insbesondere Sequenzen mit einer Länge über 500 Basenpaaren verwendet. In der Regel werden Sequenzen verwendet, die kürzer als 5000 Basenpaare sind, bevorzugt Sequenzen, die kürzer als 2500 Basenpaare sind.

Möglich ist auch die Verwendung von DNA-Sequenzen, die einen hohen Grad an Homologie zu den erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen aufweisen, aber nicht vollkommen identisch sind, in dem erfindungsgemäßen Verfahren. Die minimale Homologie sollte größer als ca. 65% sein. Die Verwendung von Sequenzen mit Homologien zwischen 95 und 100% ist zu bevorzugen.

Die Erfindung betrifft darüberhinaus die Verwendung von Sequenzen, die sich aus den unter Seq ID No. 1, Seq ID No. 2 oder Seq ID No. 3 dargestellten Sequenzen durch Insertion, Deletion oder Substitution ergeben, ohne daß dadurch die inhibierende Wirkung der anti-sense-Sequenz aufgehoben wird, in Verfahrensschritt B) des obengenannten Verfahrens.

Bei den für die Konstruktion von anti-sense Konstrukten verwendeten DNA-Fragmenten kann es sich auch um synthetische DNA-Fragmente handeln, die mit Hilfe der gängigen DNA-Synthesetechniken hergestellt wurden.

Eine Reduktion der Citrat-Synthaseaktivität in Pflanzenzellen kann ebenfalls erreicht werden durch die Einführung einer DNA-Sequenz, die für ein Ribozym kodiert, das spezifisch Transkripte von endogenen Citrat-Synthase-Genen endonukleolytisch spaltet. Ribozyme sind katalytisch aktive RNA-Moleküle, die in der Lage sind, RNA-Moleküle an spezifischen Zielsequenzen zu spalten. Mit Hilfe gentechnologischer Methoden ist es möglich, die Spezifität von Ribozymen zu verändern. Es existieren verschiedene Klassen von Ribozymen. Für die praktische Anwendung mit dem Ziel, das Transkript eines bestimmten Gens gezielt zu spalten, werden

bevorzugt Vertreter zweier verschiedener Gruppen von Ribozymen verwendet. Die eine Gruppe wird gebildet von Ribozymen die dem Typ der Gruppe I-Intron-Ribozymen zuzuordnen sind. Die zweite Gruppe wird von Ribozymen gebildet, die als charakteristisches Strukturmerkmal ein sogenanntes "hammerhead"-Motiv aufweisen. Die spezifische Erkennung des Ziel-RNA-Moleküls kann modifiziert werden durch Änderung der Sequenzen, die dieses Motiv flankieren. Diese Sequenzen bestimmen über Basenpaarung mit Sequenzen im Zielmolekül die Stelle, an der die katalytische Reaktion und somit die Spaltung des Zielmoleküls erfolgt. Da die Sequenzanforderungen für eine effiziente Spaltung äußerst gering sind, erscheint es daher im Prinzip möglich, spezifische Ribozyme für praktisch jedes beliebige RNA-Molekül zu entwickeln.

Die Herstellung genetisch veränderter Kartoffelpflanzen, deren Aktivität der Citrat-Synthase drastisch reduziert ist, kann daher auch erfolgen durch Einführung und Expression eines rekombinanten doppelsträngigen DNA-Moleküls in Pflanzen, das sich zusammensetzt aus:

- a) einem in Pflanzen funktionalen Promotor
- b) einer DNA-Sequenz, die für eine katalytische Domäne eines Ribozyms kodiert und die flankiert ist von DNA-Sequenzen, die homolog sind zu Sequenzen des Zielmoleküls, und
- c) , falls erforderlich, einem in Pflanzen funktionalen Signal für die Transkriptionstermination und Polyadenylierung eines RNA-Moleküls.

Für die unter Punkt b) genannte Sequenz kommt z.B. die katalytische Domäne der Satelliten-DNA des SCMo-Virus (Davies et al., 1990, Virology, 177:216-224) oder die der Satelliten-DNA des TobR-Virus (Steinecke et al., 1992, EMBO J., 11:1525-1530; Haseloff and Gerlach, 1988, Nature 334:585-591) in Betracht.

Die DNA-Sequenzen, die die katalytische Domäne flankieren, werden gebildet von DNA-Sequenzen, die homolog sind zu den Sequenzen endogener Citrat-Synthase-Gene.

Für die unter a) und c) genannten Sequenzen gilt dasselbe, das schon oben für die Konstruktion von anti-sense-Konstrukten angeführt wurde.

Es wurde gefunden, daß es nach der Einführung des Plasmids pKS-CSa (DSM 8880) in Zellen und Integration in das Genom einer Kartoffelpflanze neben der Inhibierung der Blütenbildung zu einer verstärkten Synthese von Stärke in den Kartoffelknollen kommt.

Durch die Kultivierung derartig veränderter Pflanzen ist es möglich, auf die Verwendung synthetischer Wachstumsregulatoren zu verzichten und somit Kosten zu senken und Risiken für die Umwelt zu vermeiden.

Die gezielte Inhibierung der Blütenbildung über die Reduktion der Citrat-Synthaseaktivität ist daher nicht nur für die Kartoffel von Interesse, sondern sollte von breiterer Bedeutung für die Pflanzenzüchtung und die Landwirtschaft sein. Genannt sei z.B. die Möglichkeit, durch Kombination der erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen mit exogen regulierbaren Steuerelementen eine zeitlich determinierte Blühinduktion oder -inhibierung zu erreichen. Dies kann für die Vermeidung von Frostschäden eine Rolle spielen.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann sowohl auf dikotyle Pflanzen als auch auf monokotyle Pflanzen angewendet werden. Pflanzen, denen dabei besonderes Interesse gilt, sind Nutzpflanzen, wie Getreidearten (z.B. Roggen, Weizen, Hafer, Gerste etc.), Obstarten (z.B. Aprikose, Pfirsich, Apfel, Pflaume ect.), Gemüsearten (z.B. Tomaten, Broccoli, Spargel etc.), Zierpflanzen oder andere wirtschaftlich interessante Pflanzenarten (z.B. Tabak, Raps, Sojabohne, Sonnenblume etc.).

Von besonderem Interesse ist die Anwendung der vorliegenden Erfindung bei der Zuckerrübe. Ein wesentliches Problem beim Zuckerrübenanbau betrifft das Auftreten von "Schossen" bereits im ersten Jahr. Neben der damit einhergehenden Ertragseinbuße führt diese Schossung zur Bildung von Blüten und damit von Samen, die in der Fruchtwechselfolge stark störende Effekte aufweisen. Da die Schossung durch niedrige Temperaturen induziert wird, wird gegenwärtig das Saatgut relativ spät ausgesetzt (im April/Mai), um eine Schossung zu vermeiden. Die Inhibierung der Citrat-

Synthaseaktivität führt, wie hier gezeigt, in transgenen Kartoffeln zur Inhibierung der Blütenbildung. Aufgrund dieser Beobachtung ist es offensichtlich, daß eine Inhibierung der Citrat-Synthase in Zuckerrüben zu einer Reduktion der Schossung führt. Dieses erlaubt, den Zuckerrübensamen früher auszulegen, was dann aufgrund der verlängerten Vegetationsperiode zu einem erhöhten Ertrag führt. Die vorliegende Erfindung stellt nun DNA-Sequenzen aus der Zuckerrübe zur Verfügung (Seq ID No. 2), die für eine Citrat-Synthase kodieren. Mit Hilfe dieser Sequenzen ist es möglich, transgene Zuckerrüben nach einem der oben beschriebenen Verfahren herzustellen, bei denen die Citrat-Synthaseaktivität in den Zellen ~~stark~~ reduziert ist, wodurch es zu einer Inhibierung bzw. Verzögerung der Blütenbildung kommt.

Die Speicherorgane der Kartoffel enthalten als Speicherstoff im wesentlichen Stärke. Die Metabolisierung der Stärke durch Respiration liefert die Energie, die beim Auskeimen der Knolle benötigt wird. Im Falle der Saatkartoffeln ist das jahreszeitlich frühe Auskeimen der Knollen von Interesse; bei Kartoffelknollen, die zu Speisezwecken verwendet werden, ist die Bildung von Sprossen jedoch nachteilig. Einerseits steigt im Verlauf der Auskeimung die Respiration stark an, was in erster Linie auf eine Metabolisierung des Hauptspeicherstoffes Stärke zurückzuführen ist, andererseits verändert sich auch die Konsistenz der Knolle, die an Festigkeit verliert und im Geschmack nachläßt. Um das Auskeimen während der Lagerung oder des Transports zu verhindern, müssen diese trocken und kühl gehalten werden, da Temperaturen über 8°C und Feuchtigkeit als Indikatoren des Beginns der Vegetationsphase Signale für die Sproßbildung sind. Diese Art der Lagerung ist zum einen sehr kostenintensiv, da sie spezielle klimatisierte Räume erfordert, und zum anderen hat sie auch negative Konsequenzen für die stoffliche Zusammensetzung der Knolle: niedrige Temperaturen führen bei Kartoffelknollen zu einer Umwandlung von Stärke in wasserlösliche Zucker. Dieser als *cold sweetening* bezeichnete Effekt wird als eine Adaptation an Standorte mit Temperaturen unter dem Gefrierpunkt diskutiert, da wäßrige Lösungen mit steigender Konzentration an gelösten Stoffen eine zunehmende Gefrierpunktserniedrigung aufweisen. Der Abbau von Stärke in den Knollen zu reduzierenden Zuckern führt zu einer

Erhöhung der Konzentration gelöster Stoffe und senkt insofern die Temperatur, bei der es zur Bildung von Eiskristallen in den Zellen kommt. Die Qualität der Kartoffelknolle als Nahrungsmittel wird jedoch durch das *cold sweetening* erheblich herabgesetzt, da die gesteigerte Konzentration an reduzierenden Zuckern die Konsistenz der Knollen verändert, beispielsweise kommt es beim Fritieren zu einer unerwünschten Braunfärbung des Gewebes infolge einer Maillard-Reaktion.

Überraschend wurde gefunden, daß nach Einführung des Plasmids pKS-CSa (DSM 8880) in Zellen und Integration in das Genom einer Kartoffelpflanze die Metabolisierung der Stärke in den Speichergeweben inhibiert und dadurch das Auskeimen der Kartoffelknollen unterbunden wird. Dies führt zu einer verbesserten Lagerungsfähigkeit der Knollen, so daß diese für lange Zeit bei Raumtemperatur gelagert werden können.

Bereits vor dem Auskeimen findet auch in der ruhenden Kartoffelknolle eine Metabolisierung des Speicherstoffes Stärke statt. Diese ist zwar im Vergleich zu der während der Keimung stattfindenden Metabolisierung relativ gering, kann aber dennoch zu erheblichen Verlusten an Stärke bei langer Lagerung der Kartoffelknollen führen.

Durch Inhibierung der Respiration in den Knollen, können diese Lagerungsverluste verringert werden.

Durch Modifikation der in Ausführungsbeispiel 3 und 8 beschriebenen Durchführungen kann auch eine Steigerung der Citrat-Synthaseaktivität in den Geweben einer transformierten Pflanze erreicht werden. Hierzu wird eine für Citrat-Synthase kodierende DNA-Sequenz in *sense*-Orientierung an einen Promotor fusioniert, d.h. das 3'-Ende des Promotors wird mit dem 5'-Ende der kodierenden DNA-Sequenz verknüpft. Dies führt zur Expression einer für Citrat-Synthase kodierenden mRNA und folglich zu einer verstärkten Synthese dieses Enzyms. Die Steigerung der Citrat-Synthaseaktivität in den Zellen führt zu verstärkter Blüten- und damit Fruchtbildung. Ein derartiger Effekt ist wünschenswert bei Kulturpflanzen wie z.B. Tomate, Paprika, oder Baumwolle und bei verschiedenen Zierpflanzen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist daher ein Verfahren zur Induktion der Blütenbildung in Pflanzen, dadurch gekennzeichnet, daß

- a) in das Genom einer Pflanzenzelle DNA stabil integriert wird, die homologen oder heterologen Ursprungs ist und die für ein Protein mit Citrat-Synthase-Aktivität kodiert,
- b) diese DNA durch Kombination mit geeigneten, die Transkription steuernden Elementen konstitutiv oder induziert exprimiert wird,
- c) es aufgrund dieser Expression zu einer Steigerung der Citrat-Synthaseaktivität in den transgenen Zellen kommt und
- d) aus den transgenen Zellen Pflanzen regeneriert werden.

Die unter Punkt a) des Verfahrens genannten DNA-Sequenzen, die für Citrat-Synthase kodieren, können dabei sowohl pro- als auch eukaryontischen Ursprungs sein. Bekannt sind beispielsweise für Citrat-Synthase kodierende DNA-Sequenzen aus folgenden Organismen: *Bacillus subtilis* (U05256 und U05257), *Arabidopsis thaliana* (Z17455), *A. anitraum* (M33037), *B. coagulans* (M74818), *C. burnetii* (M36338), *E. coli* (V01501), *M. smegmatis* (X60513), *P. aeruginosa* (M29728), *R. prowazekii* (M17149), *T. acidophilum* (X55282), *T. thermophila* (D90117), Schwein (M21197), *N. crassa* (M84187) und *S. cerevisiae* (Z11113, Z23259, M14686, M54982, X00782). Die in den Klammern angegebenen Zahlen geben jeweils die Zugriffsnummern an, unter denen diese Sequenzen in der GenEMBL-Datenbank zugänglich sind.

Eine besondere Ausführungsform dieses erfindungsgemäßen Verfahrens besteht in einem Verfahren, bei dem die für eine Citrat-Synthaseaktivität kodierende DNA-Sequenz eine Nukleotidsequenz umfaßt, die für ein Protein mit der unter Seq ID No. 1 oder Seq ID No. 2 oder Seq ID No. 3 angegebenen Aminosäuresequenz kodiert. Es können auch kürzere DNA-Sequenzen verwendet werden, die nur für Teile der unter Seq ID No. 1 oder Seq ID No. 2 oder Seq ID No. 3 angegebenen Aminosäuresequenz kodieren, solange gewährleistet ist, daß das resultierende Protein die enzymatische Aktivität einer Citrat-Synthase aufweist.

Eine besonders bevorzugte Ausführungsform besteht in einem Verfahren, bei dem die für eine Citrat-Synthaseaktivität kodierende

DNA-Sequenz die unter Seq ID No. 1 oder Seq ID No. 2 oder Seq ID No. 3 angegebene Nukleotidsequenz oder einen Teil davon umfaßt, wobei dieser Teil lang genug ist, um für ein Protein zu kodieren, das Citrat-Synthaseaktivität aufweist.

Für die Wahl eines geeigneten Promotors gilt dasselbe, was oben schon im Zusammenhang mit den erfindungsgemäßen Verfahren zur Inhibierung der Blütenbildung gesagt wurde.

Durch Kombination der erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen mit exogen regulierbaren Steuerelementen, z.B. temperaturinduzierten Promotoren, besteht auch die Möglichkeit der zeitlich determinierten Blühinduktion oder Blühinhibierung, je nachdem ob die DNA-Sequenz in *sense*- oder *antisense*-Orientierung an den Promotor fusioniert ist.

So sind unter anderem Promotoren für eine spezifische Expression in Blütenanlagen (Huijser et al. (1992) EMBO J. 11:1239-1249) oder in photosynthetisch aktiven Geweben bekannt.

Zur Verhinderung des Auskeimens von Kartoffelknollen, sowie der Lagerverluste durch Metabolisierung der Stärke sind solche Promotoren sinnvoll, die eine Aktivierung der Transkription in den Speicherorganen sicherstellen. Durch Kombination mit exogen regulierbaren Steuerelementen, beispielsweise wundinduzierbaren oder temperaturregulierten Promotoren, kann auch das Problem der vegetativen Vermehrung bei Kartoffelpflanzen, deren Knollen bei Inhibierung der Citrat-Synthase nicht auskeimen, gelöst werden. Bei der Zuckerrübe kann in analoger Weise durch Verwendung eines rübenspezifischen Promotors die Respiration reduziert und dadurch ein Ertragsverlust durch Zuckerabbau in den Rüben vermindert werden.

Die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen können auch in Plasmide eingebracht werden, die eine Mutagenese oder eine Sequenzveränderung durch Insertion, Deletion oder Rekombination von DNA-Sequenzen in prokaryontischen oder eukaryontischen Systemen erlauben.

Die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen können ferner dazu genutzt werden, um aus dem Genom von Pflanzen verschiedener Spezies homologe Sequenzen zu isolieren, die ebenfalls für eine Citrat-

Synthese kodieren. Homologie bedeutet in diesem Zusammenhang eine Sequenzidentität von mindestens 60%, vorzugsweise über 80% und insbesondere über 95%. Die Identifizierung und Isolierung derartiger Sequenzen erfolgt dabei nach Standardverfahren (siehe z.B. Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2. Aufl. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY). Mit diesen Sequenzen können wiederum Konstruktionen zur Transformation von Pflanzen oder Mikroorganismen hergestellt werden.

Zur Vorbereitung der Einführung fremder Gene in höhere Pflanzen stehen eine große Anzahl von Klonierungsvektoren zur Verfügung, die ein Replikationssignal für *E.coli* und ein Markergen zur Selektion transformierter Bakterienzellen enthalten. Beispiele für derartige Vektoren sind pBR322, pUC-Serien, M13mp-Serien, pACYC184 usw. Die gewünschte Sequenz kann an einer passenden Restriktionsschnittstelle in den Vektor eingeführt werden. Das erhaltene Plasmid wird für die Transformation von *E.coli*-Zellen verwendet. Transformierte *E.coli*-Zellen werden in einem geeigneten Medium gezüchtet, anschließend geerntet und lysiert. Das Plasmid wird wiedergewonnen. Als Analysemethoden zur Charakterisierung der gewonnenen Plasmid-DNA werden im allgemeinen Restriktionsanalysen, Gelelektrophoresen und weitere biochemisch-molekularbiologische Methoden eingesetzt. Nach jeder Manipulation kann die Plasmid DNA gespalten und mit anderen DNA-Sequenzen verknüpft werden. Jede Plasmid-DNA-Sequenz kann in den gleichen oder anderen Plasmiden kloniert werden.

Für die Einführung von DNA in eine pflanzliche Wirtszelle stehen eine Vielzahl von Techniken zur Verfügung. Diese Techniken umfassen die Transformation pflanzlicher Zellen mit T-DNA unter Verwendung von *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes* als Transformationsmittel, die Fusion von Protoplasten, die Injektion, die Elektroporation von DNA, die Einbringung von DNA mittels der biolistischen Methode sowie weitere Möglichkeiten. Bei der Injektion und Elektroporation von DNA in Pflanzenzellen werden an sich keine speziellen Anforderungen an die verwendeten Plasmide gestellt. Es können einfache Plasmide wie z.B. pUC-Derivate verwendet werden. Sollen aber aus derartig

transformierten Zellen ganze Pflanzen regeneriert werden, ist die Anwesenheit eines selektierbaren Markergens notwendig.

Je nach Einführungsmethode gewünschter Gene in die Pflanzenzelle können weitere DNA-Sequenzen erforderlich sein. Werden z.B. für die Transformation der Pflanzenzelle das Ti- oder Ri-Plasmid verwendet, so muß mindestens die rechte Begrenzung, häufig jedoch die rechte und linke Begrenzung der Ti- und Ri-Plasmid T-DNA als Flankenbereich mit den einzuführenden Genen verbunden werden.

Werden für die Transformation Agrobakterien verwendet, muß die einzuführende DNA in spezielle Plasmide kloniert werden, und zwar entweder in einen intermediären Vektor oder in einen binären Vektor. Die ~~intermediären~~ Vektoren können aufgrund von Sequenzen, die homolog zu Sequenzen in der T-DNA sind, durch homologe Rekombination in das Ti- oder Ri-Plasmid der Agrobakterien integriert werden. Dieses enthält außerdem die für den Transfer der T-DNA notwendige *vir*-Region. Intermediäre Vektoren können nicht in Agrobakterien replizieren. Mittels eines Helferplasmids kann der intermediäre Vektor auf *Agrobacterium tumefaciens* übertragen werden (Konjugation). Binäre Vektoren können sowohl in *E.coli* als auch in Agrobakterien replizieren. Sie enthalten ein Selektionsmarker-Gen und einen *Linker* oder *Polylinker*, welche von der rechten und linken T-DNA Grenzregion eingerahmt werden. Sie können direkt in die Agrobakterien transformiert werden (Holsters et al. (1978) Mol. Gen. Genet. 163:181-187). Das als Wirtszelle dienende Agrobakterium soll ein Plasmid, das eine *vir*-Region trägt, enthalten. Die *vir*-Region ist für den Transfer der T-DNA in die Pflanzenzelle notwendig. Zusätzliche T-DNA kann vorhanden sein. Das derartig transformierte Agrobakterium wird zur Transformation von Pflanzenzellen verwendet.

Die Verwendung von T-DNA für die Transformation von Pflanzenzellen ist intensiv untersucht und ausreichend in EP 120516; Hoekema, In: The Binary Plant Vector System Offsetdrukkerij Kanters B.V., Alblasterdam (1985), Chapter V; Fraley et al., Crit. Rev. Plant. Sci., 4: 1-46 und An et al. (1985) EMBO J. 4: 277-287 beschrieben worden.

Für den Transfer der DNA in die Pflanzenzelle können Pflanzen-Explantate zweckmäßigerweise mit *Agrobacterium tumefaciens* oder

Agrobacterium rhizogenes kokultiviert werden. Aus dem infizierten Pflanzenmaterial (z.B. Blattstücke, Stengelsegmente, Wurzeln, aber auch Protoplasten oder Suspensions-kultivierte Pflanzenzellen) können dann in einem geeigneten Medium, welches Antibiotika oder Biozide zur Selektion transformierter Zellen enthalten kann, wieder ganze Pflanzen regeneriert werden. Die so erhaltenen Pflanzen können dann auf Anwesenheit der eingeführten DNA untersucht werden.

Ist die eingeführte DNA einmal im Genom der Pflanzenzelle integriert, so ist sie dort in der Regel stabil und bleibt auch in den Nachkommen ~~der~~ ursprünglich transformierten Zelle erhalten. Sie enthält normalerweise einen Selektionsmarker, der den transformierten Pflanzenzellen Resistenz gegenüber einem Biozid oder einem Antibiotikum wie Kanamycin, G 418, Bleomycin, Hygromycin oder Phosphinotricin u.a. vermittelt. Der individuelle gewählte Marker sollte daher die Selektion transformierter Zellen gegenüber Zellen, denen die eingeführte DNA fehlt, gestatten.

Die transformierten Zellen wachsen innerhalb der Pflanze in der üblichen Weise (siehe auch McCormick et al. (1986) Plant Cell Reports 5:81-84). Die resultierenden Pflanzen können normal angezogen werden und mit Pflanzen, die die gleiche transformierte Erbanlage oder andere Erbanlagen besitzen, gekreuzt werden. Die daraus entstehenden hybriden Individuen haben die entsprechenden phänotypischen Eigenschaften.

Es sollten zwei oder mehrere Generationen angezogen werden, um sicherzustellen, daß das phänotypische Merkmal stabil beibehalten und vererbt wird. Auch sollten Samen geerntet werden, um sicherzustellen, daß der entsprechende Phänotyp oder andere Eigenarten erhalten geblieben sind.

Hinterlegung

Die im Rahmen der vorliegenden Erfindung hergestellten und verwendeten Plasmide wurden bei der als internationale Hinterlegungsstelle anerkannten Deutschen Sammlung von Mikroorganismen (DSMZ) in Braunschweig, Bundesrepublik Deutschland, entsprechend den Anforderungen des Budapest

Vertrages für die internationale Anerkennung der Hinterlegung von Mikroorganismen zum Zwecke der Patentierung hinterlegt.

Am 28.12.1993 wurden bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen (DSMZ) folgende Plasmide hinterlegt (Hinterlegungsnummer):

Plasmid pPCS (DSM 8879)

Plasmid pKS-CSa (DSM 8880)

Am 10.08.1994 wurden bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen (DSMZ) folgende Plasmide hinterlegt (Hinterlegungsnummer):

Plasmid pTCS (DSM 9357)

Plasmid pSBCS (DSM 9358)

Plasmid TCSAS (DSM 9359)

Verwendete Abkürzungen

BSA	Rinderserumalbumin
EDTA	(Ethyldinitrilo)tetraessigsäure
50x Denhardt-Lösung	5 g Ficoll (Typ 400, Pharmacia)
	5 g Polyvinylpyrrolidon
	5 g Rinderserumalbumin (Fraktion V, Sigma)
	ad 500 ml mit H ₂ O
FADH ₂	Flavin-Adenin-Dinucleotid, reduziert
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
NADH	β-Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid, reduziert
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
SCMo-Virus	"subterranean clover mottle virus"
SDS	Natriumdodecylsulfat
20x SSC	175,3 g NaCl, 88,2 g Natriumcitrat

	ad 1000 ml mit H ₂ O, pH 7,0 mit 10 N
	NaOH
TobR-Virus	"tobacco ringspot virus"
Trizin	N-Tris(hydroxymethyl)-Methylglycin

Beschreibung der Abbildungen

Fig. 1 zeigt das Plasmid pPCS (DSM 8879)

Die fein gezogene Linie entspricht der Sequenz von pBluescript KS. Die starke Linie repräsentiert die cDNA, die für Citrat-Synthase aus *Solanum tuberosum* kodiert. Restriktionsschnittstellen der Insertion sind angegeben.

Fig. 2 zeigt das Plasmid pKS-CSa (DSM 8880)

Aufbau des Plasmids:

- A= Fragment A: CaMV 35S-Promotor, nt 6909-7437
(Franck et al. (1980) Cell 21:285-294)
- B = Fragment B: cDNA aus *Solanum tuberosum* kodierend für Citrat-Synthase;
BamHI/SalI-Fragment, ca. 1900 bp
Orientierung zum Promotor: anti-sense
- C= Fragment C: nt 11748-11939 der T-DNA des Ti-Plasmids pTiACH5 (Gielen et al. (1984) EMBO J. 3:835-846)

Fig. 3 zeigt das Plasmid pSBCS (DSM 9358)

Die fein gezogene Linie entspricht der Sequenz von pBluescript SK. Die starke Linie repräsentiert die cDNA, die für Citrat-Synthase aus *Beta vulgaris L.* kodiert. Restriktionsschnittstellen der Insertion sind angegeben.

Fig. 4 zeigt das Plasmid pTCS (DSM 9357)

Die fein gezogene Linie entspricht der Sequenz von pBluescript SK. Die starke Linie repräsentiert die cDNA, die für Citrat-Synthase aus *Nicotiana tabacum* kodiert. Restriktionsschnittstellen der Insertion sind angegeben.

Fig. 5 zeigt das Plasmid TCSAS (DSM 9359)

Aufbau des Plasmids:

- A= Fragment A: CaMV 35S-Promotor, nt 6909-7437
(Franck et al. (1980) Cell 21:285-294)
- B= Fragment B: cDNA aus *Nicotiana tabacum*, kodierend für
Citrat-Synthase;
BamHI/SalI-Fragment aus pTCS, ca. 1800 bp
Orientierung zum Promotor: anti-sense
- C= Fragment C: nt 11748-11939 der T-DNA des Ti-Plasmids
pTiACH5 (Gielen et al. (1984) EMBO J. 3:835-846)

Fig. 6 zeigt das Ergebnis eines Northern-Blot Experiments

Zur Analyse wurden jeweils 2 µg poly(A⁺)-mRNA aus verschiedenen transgenen Kartoffelpflanzen (Spur 4-8) und drei nicht-transformierten Kartoffelpflanzen (Spur 1-3) verwendet.

Spuren 1, 2, und 3 : Wildtyp *Solanum tuberosum* cv. Désirée

Spur 4: transgene Kartoffellinie T6

Spur 5: transgene Kartoffellinie T21

Spur 6: transgene Kartoffellinie T29

Spur 7: transgene Kartoffellinie T50

Spur 8: transgene Kartoffellinie T55

Zur Hybridisierung wurde die radioaktiv markierte cDNA der Citrat-Synthase aus Kartoffeln verwendet.

Fig. 7 zeigt das Ergebnis der Bestimmung der Citrat-Synthaseaktivität in Blättern, Knollen und in Mitochondrien aus Knollen von Wildtyp-Kartoffelpflanzen im Vergleich mit Pflanzen der transgenen Kartoffellinien T6, T29, T50 und T55

Fig. 8 zeigt transgene Kartoffelpflanzen der Linien T6 (Nr. 3 und 4) und T29 (Nr. 5 und 6), die mit dem Plasmid pKS-CSa transformiert wurden, im Vergleich mit Wildtyp-Pflanzen (Nr. 1 und 2). Die Pflanzen wurden im Gewächshaus bei 60% Luftfeuchtigkeit, bei 22°C für 16 h im Licht und bei 15°C für 8h in Dunkelheit gehalten.

Zum besseren Verständnis der dieser Erfindung zugrundeliegenden Ausführungsbeispiele werden die wichtigsten eingesetzten Verfahren im folgenden erläutert.

1. Klonierungsverfahren

Zur Klonierung in *E.coli* wurde der Vektor pBluescriptKS und der Vektor pBluescriptSK (Stratagene) verwendet.

Für die Pflanzentransformation wurden die Genkonstruktionen in den binären Vektor pBinAR kloniert.

2. Bakterienstämme

Für den pBluescriptKS-Vektor und für die pBinAR-Konstrukte wurde der *E.coli*-Stamm DH5 α (Bethesda Research Laboratories, Gaithersburgh, USA) verwendet. Für die *in vivo excision* wurde der *E.coli*-Stamm XL1-Blue verwendet.

Die Transformation der Plasmide in die Kartoffelpflanzen und Tabakpflanzen wurde mit Hilfe des *Agrobacterium tumefaciens*-Stammes C58C1 durchgeführt (Rocha-Sosa et al. (1989) EMBO J. 8:23-29).

3. Transformation von *Agrobacterium tumefaciens*

Der Transfer der DNA erfolgte durch direkte Transformation nach der Methode von Höfgen&Willmitzer (1988, Nucleic Acids Res. 16:9877). Die Plasmid-DNA transformierter Agrobakterien wurde nach der Methode von Birnboim&Doly (1979, Nucleic Acids Res. 7:1513-1523) isoliert und nach geeigneter Restriktionsspaltung gelelektrophoretisch analysiert.

4. Transformation von Kartoffeln

Zehn kleine mit dem Skalpell verwundete Blätter einer Kartoffel-Sterilkultur (*Solanum tuberosum* L.cv. Desiree) wurden in 10 ml

MS-Medium (Murashige&Skoog (1962) *Physiol. Plant.* 15: 473) mit 2% Saccharose gelegt, welches 50 µl einer unter Selektion gewachsenen *Agrobacterium tumefaciens*-Übernachtskultur enthielt. Nach 3-5 minütigem, leichtem Schütteln erfolgte eine weitere Inkubation für 2 Tage im Dunkeln. Daraufhin wurden die Blätter zur Kallusinduktion auf MS-Medium mit 1,6% Glukose, 5 mg/l Naphthylelessigsäure, 0,2 mg/l Benzylaminopurin, 250 mg/l Claforan, 50 mg/l Kanamycin, und 0,80.% Bacto Agar gelegt. Nach einwöchiger Inkubation bei 25°C und 3000 Lux wurden die Blätter zur Sproßinduktion auf MS-Medium mit 1,6% Glukose, 1,4 mg/l Zeatinribose, 20 µg/l Naphthylelessigsäure, 20 µg/l Giberellinsäure, 250 mg/l Claforan, 50 mg/l Kanamycin, und 0,80.% Bacto Agar gelegt.

5. Transformation von Tabak

Eine Übernachtskultur des entsprechenden *Agrobacterium tumefaciens*-Klons wurde abzentrifugiert (6500 rpm; 3 min) und die Bakterien wurden in YEB-Medium resuspendiert.

Tabakblätter einer Tabaksterilkultur (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN) wurden in kleine ca. 1 cm² große Stücke zerschnitten und in der Bakteriensuspension gebadet. Die Blattstücke wurden anschließend auf MS-Medium (0,7% Agar) gelegt und 2 Tage im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Blattstücke zur Sproßinduktion auf MS-Medium (0,7% Agar) mit 1,6% Glukose, 1 ng/l 6-Benzylaminopurin, 0,2 mg/l Naphthylelessigsäure, 500 mg/l Claforan und 50 mg/l Kanamycin gelegt. Das Medium wurde alle 7 bis 10 Tage gewechselt. Wenn sich Sprosse entwickelt haben, wurden die Blattstücke in Glasgefäße, die dasselbe Medium, enthielten, überführt. Entstehende Sprosse wurden abgeschnitten und auf MS-Medium + 2% Saccharose + 250 mg/l Claforan gegeben und aus ihnen ganze Pflanzen regeneriert.

6. Bestimmung der Citrat-Synthaseaktivität in Geweben transgener Kartoffelpflanzen und nicht-transformierter Kartoffelpflanzen

Für die Bestimmung der Citrat-Synthaseaktivität wurden Rohextrakte aus Knollen, Blättern und Blüten hergestellt sowie Mitochondrien aus Kartoffelknollen isoliert. Für die Herstellung von

Rohextrakten wurde das jeweilige Material in flüssigem Stickstoff gefroren, in Extraktionspuffer (Neuhaus und Stitt (1990) Planta 182:445-454) homogenisiert, zentrifugiert und der Überstand anschließend für den Aktivitätstest verwendet. Für die Isolierung von Mitochondrien aus Kartoffelknollen wurden 100-200 g frisch geerntete Knollen geschält und in 100 ml "Grinding buffer" (0,4 M Mannitol, 1 mM EDTA, 25 mM MOPS, 0,1% BSA, 10 mM β -Mercaptoethanol, 0,05 mM PMSF, pH 7,8) homogenisiert. Das Homogenat wurde durch 4 Lagen Baumwoll-Gaze filtriert und für 4 min bei 3500 g zentrifugiert. Der Überstand wurde durch 2 Lagen "Miracloth" (Calbiochem) gefiltert und nochmals für 30 min bei 18000 g zentrifugiert. Das Pellet wurde mit einer weichen Bürste in 2 ml Resuspensionspuffer (0,4 M Mannitol, 20 mM Trizin, 2 mM EDTA, pH 7,2) resuspendiert. Nach zweifacher Homogenisierung in einem "Potter"-Homogenisator wurde der Extrakt auf einen diskontinuierlichen Percoll-Gradient geschichtet und 1 h bei 72000 g zentrifugiert. Mitochondrien wurden aus der 28%/45%-Interphase entnommen, gewaschen und zweimal für 15 min bei 14500 g in "Washing buffer" (0,4 M Mannitol, 5 mM MOPS, 0,1% BSA, 0,2 mM PMSF, pH 7,5) zentrifugiert. Die Mitochondrien wurden anschließend in 100 μ l Resuspensionspuffer aufgenommen. Für die Bestimmung der Citrat-Synthaseaktivität wurden 5 μ l der Mitochondriensuspension in 100 μ l Extraktionspuffer (Neuhaus und Stitt (1990) Planta 182:445-454) aufgenommen.

Die Citrat-Synthaseaktivität wurde spektralphotometrisch bei 412 nm und 30°C nach der Methode von Srere (1967, Methods in Enzymology 13:3-22) bestimmt.

7. RNA-Extraktion und Northern Blot-Experimente

RNA wurde aus gefrorenem Pflanzenmaterial isoliert wie beschrieben in Logemann et al. (1987, Anal. Biochem. 163:21-26). Die RNA wurde denaturiert in 40% Formamid. Anschließend wurde die RNA gelelektrophoretisch auf Formaldehyd/Agarosegelen aufgetrennt und nach dem Gellauf auf Nylonmembran (Hybond N; Amersham, UK) geblottet. Die Hybridisierung gegen eine radioaktiv markierte DNA-Probe erfolgte nach Standardmethoden.

8. Pflanzenhaltung

Kartoffelpflanzen (*Solanum tuberosum*) wurden im Gewächshaus bei 60% Luftfeuchtigkeit und 22 °C für 16 h im Licht und 15 °C für 8 h in Dunkelheit gehalten. Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum*) wurden im Gewächshaus bei 60% Luftfeuchtigkeit und 25 °C für 14 h im Licht und 20 °C in Dunkelheit gehalten.

Ausführungsbeispiele

Ausführungsbeispiel 1

Klonierung einer cDNA der Citrat-Synthase aus Kartoffel

Für die Identifizierung einer cDNA aus Kartoffel, die für Citrat-Synthase kodiert, wurde zunächst ein DNA-Fragment der bereits bekannten cDNA von Citrat-Synthase aus *Arabidopsis thaliana* (Unger et al. (1989) Plant Mol. Biol. 13:411-418) amplifiziert. Hierfür wurde aus grünem Pflanzengewebe von *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen Gesamt-RNA extrahiert und aus dieser poly(A⁺)-mRNA präpariert. Diese wurde anschließend für die Herstellung von cDNA verwendet. Aus dieser cDNA-Präparation wurde mit Hilfe der Oligodesoxynukleotide

5'-AAGTGGATCCATGGTGTTCCTCGCAGCGTAT-3' und

5'-CATAGGATCCTTAAGCAGATGAAGCTTCTTA-3',

die komplementär zum 5'- bzw. 3'-Ende der kodierenden Region der cDNA der Citrat-Synthase aus *Arabidopsis thaliana* (Unger et al. (1989) Plant Mol. Biol. 13: 411-418) sind, durch eine "Polymerase Chain Reaction"- (PCR) ein 1438 bp langes DNA-Fragment isoliert, das für die Citrat-Synthase aus *Arabidopsis thaliana* kodiert. Die verwendeten Oligonukleotide führen zusätzlich an beiden Enden des amplifizierten DNA-Fragmentes BamHI-Schnittstellen ein. Das aus der PCR-Reaktion resultierende DNA-Fragment wurde mit BamHI verdaut und in das mit BamHI geschnittene Plasmid pUC9.2 ligiert. Die cDNA-Insertion dieses Plasmids wurde später als heterologe Probe für die Identifizierung einer für Citrat-Synthase kodierenden cDNA aus Kartoffel verwendet.

Für die Herstellung einer cDNA-Bibliothek wurde aus Blättern von Kartoffelpflanzen poly(A⁺)-mRNA isoliert. Ausgehend von der

poly(A⁺)-mRNA wurde cDNA hergestellt, die mit EcoRI/NotI-linkern versehen wurde, und mit der eine cDNA-Bibliothek in dem Vektor Lambda ZAP II (Stratagene) angelegt wurde (Kobmann et al. (1992) *Planta* 188:7-12). 250000 Plaques dieser cDNA-Bibliothek wurden mit Hilfe der heterologen Probe aus *Arabidopsis thaliana* auf DNA-Sequenzen hin untersucht, die homolog zu dieser sind. Dazu wurden die Plaques auf Nitrozellulose-Filter übertragen und durch NaOH-Behandlung denaturiert. Die Filter wurden anschließend neutralisiert, und die DNA auf den Filtern durch Hitzebehandlung fixiert. Die Filter wurden in 25% Formamid, 0,5% BSA, 1% SDS, 5xSSC, 5x Denhardt-Lösung, 40 mM Natriumphosphat-Puffer pH 7,2 und 100 µg/ml Lachssperma-DNA prähybridisiert für 2 Stunden bei 42°C. Anschließend wurden die Filter in 25% Formamid, 0,5% BSA, 1% SDS, 5xSSC, 5x Denhardt-Lösung, 40 mM Natriumphosphat-Puffer pH 7,2 und 100 µg/ml Lachssperma-DNA nach Zugabe der P³²-markierten, für Citrat-Synthase aus *Arabidopsis thaliana* kodierenden cDNA über Nacht bei 42°C hybridisiert. Die Filter wurden für 30 min in 5xSSC, 0,5% SDS bei 42°C und für 20 min in 3xSSC, 0,5% SDS bei 42°C gewaschen.

Phagenklone der cDNA-Bibliothek, die mit der verwendeten cDNA aus *Arabidopsis thaliana* hybridisierten, wurden unter Anwendung von Standardverfahren weiter gereinigt. Mit Hilfe der *in vivo excision*-Methode wurden von positiven Phagenklonen E.coli-Klone gewonnen, die ein doppelsträngiges pBlueskript-Plasmid mit der jeweiligen cDNA-Insertion in der EcoRI-Schnittstelle des poly-linkers enthalten. Nach Überprüfung der Größe und des Restriktionsmusters der Insertionen wurde ein geeigneter Klon einer Sequenzanalyse unterzogen.

Ausführungsbeispiel 2

Sequenzanalyse der cDNA-Insertion des Plasmids pPCS (DSM 8879)

Aus einem entsprechend Ausführungsbeispiel 1 erhaltenen E.coli-Klon wurde das Plasmid pPCS (Fig. 1) isoliert und seine cDNA-Insertion durch Standardverfahren mittels der Didesoxymethode (Sanger et al. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463-5467)

bestimmt. Die Insertion ist 1891 bp lang. Die Nukleotidsequenz (Seq. ID No. 1) ist oben angegeben.

Ausführungsbeispiel 3

Konstruktion des Plasmids pKS-CSa (DSM 8880) und Einführung des Plasmids in das Genom von Kartoffelpflanzen

Aus dem Plasmid pPCS wurde durch BamHI/SalI-Verdau ein ca. 1,9 kb langes DNA-Fragment isoliert, das die oben angegebene Sequenz (Seq. ID No. 1) aufweist und die kodierende Region für Citrat-Synthase aus Kartoffeln enthält. Dieses DNA-Fragment wurde in den mit BamHI/SalI geschnittenen Vektor pBinAR (Höfgen und Willmitzer (1990) Plant Sci. 66:221-230) kloniert. Der Vektor pBinAR ist ein Derivat des binären Vektors Bin19 (Bevan (1984) Nucleic Acids Res. 12:8711-8721).

Das resultierende Plasmid wurde pKS-CSa genannt und ist in Fig. 2 dargestellt.

Durch die Insertion des cDNA-Fragmentes entsteht eine Expressionskassette, die folgendermaßen aus den Fragmenten A, B und C aufgebaut ist (Fig. 2) :

Das Fragment A (529 bp) enthält den 35S-Promotor des Cauliflower-Mosaik-Virus (CaMV). Das Fragment umfaßt die Nukleotide 6909 bis 7437 des CaMV (Franck et al. (1980) Cell 21:285-294)

Das Fragment B umfaßt die proteinkodierende Region der Citrat-Synthase aus Kartoffeln. Diese wurde wie oben beschrieben als BamHI/SalI-Fragment aus pPCS isoliert und in *anti-sense* Orientierung an den Promotor in pBinAR fusioniert.

Fragment C (192 bp) enthält das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTiACH5 (Gielen et al. (1984) EMBO J. 3:835-846).

Die Größe des Plasmids pKS-CSa beträgt ca. 12,9 kb.

Der Vektor pKS-CSa wurde mittels *Agrobacterium tumefaciens* vermittelter Transformation in Kartoffeln transferiert. Intakte Pflanzen wurden aus den transformierten Zellen regeneriert.

Als Ergebnis der Transformation zeigten transgene Kartoffelpflanzen in verschiedenem Ausmaß eine Verringerung der für die Citrat-Synthase kodierenden mRNA (siehe Fig. 6). Es wurden 2 µg poly(A⁺)-mRNA in einem Northern-Blot Experiment mit der Sonde für Citrat-Synthase aus Kartoffeln hybridisiert. Das in Wildtyp-Pflanzen auftretende, für Citrat-Synthase kodierende Transkript (Spuren 1 bis 3) ist kürzer als das Transkript der anti-sense-Expressions-kassette (siehe beispielsweise Spur 6), wodurch sich erkennen läßt, daß es in den verschiedenen transgenen Pflanzen zu einer unterschiedlich starken Reduktion der endogenen Transkripte gekommen ist.

Transgene Kartoffelpflanzen, die eine Verringerung der für die Citrat-Synthase kodierenden mRNA aufwiesen, wurden im Hinblick auf die Citrat-Synthaseaktivität in verschiedenen Geweben untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen an Blättern, Knollen und aus Knollen isolierten Mitochondrien sind in Fig. 7 dargestellt.

Die Verringerung der Citrat-Synthaseaktivität hat in den transgenen Pflanzen einen erheblichen Effekt auf die Blütenbildung, dessen Ausprägung vom Ausmaß der Inhibierung der Citrat-Synthaseaktivität abhängt.

Transformierte Kartoffelpflanzen, bei denen die Citrat-Synthaseaktivität stark verringert ist (vergleiche Fig. 7), sind in ihrer Blütenbildung stark bis vollkommen inhibiert (siehe Fig. 8).

Pflanzen bei denen die Citrat-Synthaseaktivität nur mäßig verringert ist, zeigen eine verspätete Blütenbildung und setzen weniger Blüten an oder bilden nur Blütenknospen, die sich nicht zu funktionsfähigen Blüten weiterentwickeln.

Mit Hilfe der vorliegenden Erfindung ist es daher auch möglich Pflanzen nach dem erfindungsgemäßen Verfahren herzustellen, bei denen die Citratsynthase-Aktivität in unterschiedlichem Ausmaß inhibiert ist, so daß aus den transgenen Pflanzen solche ausgewählt werden können, die den gewünschten Phänotyp, beispielsweise eine vollkommene Inhibition der Blütenbildung oder eine Blütenbildung,

die im Vergleich zu untransformierten Pflanzen verspätet einsetzt, aufweisen.

Ausführungsbeispiel 4

Klonierung einer cDNA kodierend für Citrat-Synthase aus Tabak (*Nicotiana tabacum*)

Für die Identifizierung einer cDNA aus *Nicotiana tabacum*, die für Citrat-Synthase kodiert, wurde eine cDNA-Bank von Blattgewebe von Tabak, wie in Ausführungsbeispiel 1 für Kartoffel beschrieben, hergestellt. 250 000 Plaques dieser cDNA-Bank wurden mit Hilfe einer radioaktiven DNA-Sonde nach Sequenzen durchgemustert, die für Citrat-Synthase kodieren. Als Sonde wurde die cDNA aus *Solanum tuberosum* verwendet, die für Citrat-Synthase kodiert (1.4 kb NruI/HindII-Fragment aus pPCS; siehe Ausführungsbeispiel 1 und 2, sowie Seq ID No. 1). Die Identifizierung und Isolierung von Phagenklonen, die mit der verwendeten radioaktiven DNA-Probe hybridisierten, erfolgte wie in Ausführungsbeispiel 1 beschrieben mit dem Unterschied, daß die Plaques auf Nylonmembranen übertragen wurden und für die Prähybridisierung und die Hybridisierung folgender Puffer verwendet wurde: 0.25 M Natriumphosphatpuffer pH 7.2, 10 mM EDTA, 7% SDS, 10 µg BSA.

Mit Hilfe der *in vivo excision*-Methode wurden von positiven Phagenklonen *E.coli*-Klone gewonnen, die ein doppelsträngiges Bluescript-Plasmid mit der jeweiligen cDNA-Insertion enthalten. Nach Überprüfung der Größe und des Restriktionsmusters der Insertionen wurde ein geeigneter Klon einer Sequenzanalyse unterzogen.

Ausführungsbeispiel 5

Sequenzanalyse der cDNA-Insertion des Plasmids pTCS (DSM 9357)

Aus einem entsprechend Ausführungsbeispiel 4 erhaltenen *E.coli*-Klon wurde das Plasmid pTCS (Fig. 4) isoliert und seine cDNA-Insertion durch Standardverfahren mittels der Didesoxymethode (Sanger et al. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463-5467)

bestimmt. Die Insertion ist 1747 bp lang. Die Nukleotidsequenz ist oben unter Seq ID No. 3 angegeben.

Ausführungsbeispiel 6

Klonierung einer cDNA kodierend für Citrat-Synthase aus Zuckerrübe (*Beta vulgaris* L.)

Für die Identifizierung einer cDNA aus Zuckerrübe, die für Citrat-Synthase kodiert, wurde eine cDNA-Bank von Blattgewebe von Zuckerrüben (*Beta vulgaris* L. Zuchtlinie 5S 0026) hergestellt indem poly(A)⁺-RNA aus Blattgewebe isoliert und diese für die cDNA-Synthese mit Hilfe kommerzieller Kits (Pharmacia LKB, Stratagene) nach der Methode von Gubler und Hoffmann (1983, Gene 25:263-269) verwendet wurde. 250 000 Plaques einer derartigen cDNA-Bank wurden wie in Ausführungsbeispiel 4 beschrieben mit Hilfe radioaktiver DNA-Sonden nach Sequenzen durchgemustert, die für Citrat-Synthase kodieren. Als Sonde wurde eine Mischung aus der radioaktiv markierten cDNA aus *Solanum tuberosum*, die für Citrat-Synthase kodiert (siehe Ausführungsbeispiel 1, 2 und 4, sowie Seq ID No. 1), und der radioaktiv markierten cDNA aus *Nicotiana tabacum*, die für Citrat-Synthase kodiert (siehe Ausführungsbeispiel 4 und 5, sowie Seq ID No. 3), verwendet. Die Identifizierung und Isolierung von Phagenklonen, die mit der verwendeten radioaktiven DNA-Probe hybridisierten, erfolgte wie in Ausführungsbeispiel 1 beschrieben.

Mit Hilfe der *in vivo excision*-Methode wurden von positiven Phagenklonen *E.coli*-Klone gewonnen, die ein doppelsträngiges pBluescript-Plasmid mit der jeweiligen cDNA-Insertion enthalten. Nach Überprüfung der Größe und des Restriktionsmusters der Insertionen wurde ein geeigneter Klon einer Sequenzanalyse unterzogen.

Ausführungsbeispiel 7

Sequenzanalyse der cDNA-Insertion des Plasmids pSBCS (DSM 9358)

Aus einem entsprechend Ausführungsbeispiel 6 erhaltenen *E.coli*-Klon wurde das Plasmid pSBCS (Fig. 3) isoliert und seine cDNA-

Insertion durch Standardverfahren mittels der Didesoxymethode (Sanger et al. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463-5467) bestimmt. Die Insertion ist 1551 bp lang. Die Nukleotidsequenz ist oben unter Seq ID No. 2 angegeben.

Ausführungsbeispiel 8

Konstruktion des Plasmids TCSAS (DSM 9359) und Einführung des Plasmids in das Genom von Tabakpflanzen

Aus dem Plasmid pTCS wurde durch BamHI/SalI-Verdau ein ca. 1.800 kb langes DNA-Fragment isoliert, das die oben angegebene Sequenz (Seq ID No. 3) aufweist und die kodierende Region für Citrat-Synthase aus *Nicotiana tabacum* enthält. Dieses DNA-Fragment wurde in den mit BamHI/SalI geschnittenen Vektor pBinAR (Höfgen und Willmitzer (1990) Plant Sci. 66:221-230) kloniert. Der Vektor pBinAR ist ein Derivat des binären Vektors Bin19 (Bevan (1984) Nucleic Acids Res. 12:8711-8721).

Das resultierende Plasmid wurde TCSAS genannt und ist in Fig. 5 dargestellt.

Durch die Insertion des cDNA-Fragmentes entsteht eine Expressionskassette, die folgendermaßen aus den Fragmenten A, B und C aufgebaut ist (Fig. 5) :

Das Fragment A (529 bp) enthält den 35S-Promotor des Cauliflower-Mosaik-Virus (CaMV). Das Fragment umfaßt die Nukleotide 6909 bis 7437 des CaMV (Franck et al. (1980) Cell 21:285-294)

Das Fragment B enthält neben flankierenden Bereichen die proteinkodierende Region der Citrat-Synthase aus *Nicotiana tabacum*. Diese wurde wie oben beschrieben als BamHI/SalI-Fragment aus pTCS isoliert und in *anti-sense* Orientierung an den Promotor in pBinAR fusioniert.

Fragment C (192 bp) enthält das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTiACH5 (Gielen et al. (1984) EMBO J. 3:835-846).

Die Größe des Plasmids TCSAS beträgt ca. 12,75 kb.

Das Plasmid wurde mit Hilfe Agrobakterien-vermittelter Transformation in Tabakpflanzen transferiert wie oben beschrieben. Aus den transformierten Zellen wurden ganze Pflanzen regeneriert. Als Ergebnis der Transformation zeigten transgene Tabakpflanzen eine Verringerung der intrazellulären Citrat-Synthase-Aktivität.

SEQ ID NO.: 1
 ART DER SEQUENZ: Nukleotid mit entsprechendem Protein
 SEQUENZLÄNGE: 1891 Basenpaare

STRANGFORM: Einzelstrang
 TOPOLOGIE: linear
 ART DES MOLEKÜLS: cDNA

URSPRÜNGLICHE HERKUNFT

ORGANISMUS: Solanum tuberosum
 HERKUNFT: cDNA-Bibliothek im Plasmid pBluescriptKS
 MERKMALE: von Nukleotid 73-1485 kodierende Region

EIGENSCHAFTEN: Citrat-Synthase (E.C. 4.1.3.7.)

TT TTTCGTTCCA TCAGCCTACT 22

TGAGATGTAT TCCCACTGGT AAAAGTTAAT TTTTTTGATT TTCGCGAGCA 72

ATG GTG TTC TAC CGT AGC GTT TCG TTG CTG TCA AAG CTC CGC TCT 117
 Met Val Phe Tyr Arg Ser Val Ser Leu Leu Ser Lys Leu Arg Ser
 1 5 10 15

CGA GCG GTC CAA CAG TCA AAT GTT AGC AAT TCT GTG CGC TGG CTT 162
 Arg Ala Val Gln Gln Ser Asn Val Ser Asn Ser Val Arg Trp Leu
 20 25 30

CAA GTC CAA ACC TCT TCC GGT CTT GAT CTG CGT TCT GAG CTG GTA 207
 Gln Val Gln Thr Ser Ser Gly Leu Asp Leu Arg Ser Glu Leu Val
 35 40 45

CAA GAA TTG ATT CCT GAA CAA CAG GAT CGC CTG AAA AAG ATC AAG 252
 Gln Glu Leu Ile Pro Glu Gln Glu Asp Arg Leu Lys Lys Ile Lys
 50 55 60

TCA GAT ATG AAA GGT TCA ATT GGG AAC ATC ACA GTT GAT ATG GTT 297
 Ser Asp Met Lys Gly Ser Ile Gly Asn Ile Thr Val Asp Met Val
 65 70 75

CTT GGT GGA ATG AGA GGA ATG ACA GGA TTA CTG TGG AAA CCT CAT	342
Leu Gly Gly Met Arg Gly Met Thr Gly Leu Leu Trp Lys Pro His	
80 85 90	
TAC CTT GAC CCT GAT GAG GGA ATT CGC TTC CGG GGG TTG TCT ATA	387
Tyr Leu Asp Pro Asp Glu Gly Ile Arg Phe Arg Gly Leu Ser Ile	
95 100 105	
CCT GAA TGC CAA AAG GTA TTA CCT GCA GCA AAG CCT GGG GGT GAG	432
Pro Glu Cys Gln Lys Val Leu Pro Ala Ala Lys Pro Gly Gly Glu	
110 115 120	
CCC TTG CCT GAA GGT CTT CTC TGG CTT CTT TTA ACA GGA AAG GTG	477
Pro Leu Pro Glu Gly Leu Leu Trp Leu Leu Leu Thr Gly Lys Val	
125 130 135	
CCA TCA AAA GAG CAA GTG AAT TCA ATT GTC TCA GGA ATT GCA GAG	522
Pro Ser Lys Glu Gln Val Asn Ser Ile Val Ser Gly Ile Ala Glu	
140 145 150	
TCG GGC ATC ATA TCC CTG ATC ATC ATG TAT ACA ACT ATT GAT GCC	567
Ser Gly Ile Ile Ser Leu Ile Ile Met Tyr Thr Thr Ile Asp Ala	
155 160 165	
TTA CCA GTC ACA GCT CAT CCA ATG ACC CAG TTT GCT ACT GGA GTC	612
Leu Pro Val Thr Ala His Pro Met Thr Gln Phe Ala Thr Gly Val	
170 175 180	
ATG GCT CTT CAG GTT CAA AGT GAA TTT CAA AAG GCA TAC GAG AAA	657
Met Ala Leu Gln Val Gln Ser Glu Phe Gln Lys Ala Tyr Glu Lys	
185 190 195	
GGG ATT CAC AAA TCA AAG TAT TGG GAA CCA ACA TAT GAG GAT TCC	702
Gly Ile His Lys Ser Lys Tyr Trp Glu Pro Thr Tyr Glu Asp Ser	
200 205 210	

ATG	AAT	CTG	ATT	GCT	CAA	GTT	CCA	CTT	GTT	GCT	GCT	TAT	GTT	TAT	747
Met	Asn	Leu	Ile	Ala	Gln	Val	Pro	Leu	Val	Ala	Ala	Tyr	Val	Tyr	
				215					220					225	
CGC	AGG	ATG	TAC	AAG	AAT	GGT	GAC	ACT	ATA	CCT	AAG	GAT	GAA	TCC	792
Arg	Arg	Met	Tyr	Lys	Asn	Gly	Asp	Thr	Ile	Pro	Lys	Asp	Glu	Ser	
				230					235					240	
CTG	GAT	TAT	GGT	GCA	AAT	TTT	GCT	CAC	ATG	CTT	GGT	TTC	AGT	AGC	837
Leu	Asp	Tyr	Gly	Ala	Asn	Phe	Ala	His	Met	Leu	Gly	Phe	Ser	Ser	
				245					250					255	
TCT	GAA	ATG	CAT	GAA	CTT	CTT	ATG	AGG	CTC	TAT	GTA	ACA	ATA	CAC	882
Ser	Glu	Met	His	Glu	Leu	Leu	Met	Arg	Leu	Tyr	Val	Thr	Ile	His	
				260					265					270	
AGT	GAT	CAT	GAA	GGT	GGT	AAT	GTC	AGT	GCT	CAC	ACC	GGT	CAC	TTG	927
Ser	Asp	His	Glu	Gly	Gly	Asn	Val	Ser	Ala	His	Thr	Gly	His	Leu	
				275					280					285	
GTT	GCT	AGT	GCT	TTG	TCT	GAT	CCT	TAC	CTC	TCC	TTT	GCT	GCT	GCT	972
Val	Ala	Ser	Ala	Leu	Ser	Asp	Pro	Tyr	Leu	Ser	Phe	Ala	Ala	Ala	
				290					295					300	
TTG	AAT	GGT	TTA	GCC	GGA	CCA	CTT	CAT	GGT	TTA	GCC	AAT	CAG	GAA	1017
Leu	Asn	Gly	Leu	Ala	Gly	Pro	Leu	His	Gly	Leu	Ala	Asn	Gln	Glu	
				305					310					315	
GTT	TTG	CTA	TGG	ATA	AAA	TCT	GTT	GTA	GAA	GAA	TGT	GGG	GAG	AAC	1062
Val	Leu	Leu	Trp	Ile	Lys	Ser	Val	Val	Glu	Glu	Cys	Gly	Glu	Asn	
				320					325					330	
AAT	TCC	AAA	GAG	CAG	TTG	AAA	GAC	TAT	GTT	TGG	AAA	ACA	TTG	AAC	1107
Ile	Ser	Lys	Glu	Gln	Leu	Lys	Asp	Tyr	Val	Trp	Lys	Thr	Leu	Asn	
				335					340					345	

AGT GGC AAG GTT GTC CCT GGT TTT GGA CAT GGA GTT CTG CGA AAG	1152
Ser Gly Lys Val Val Pro Gly Phe Gly His Gly Val Leu Arg Lys	
350 355 360	
ACT GTA CCA AGA TAT ACA TGC CAG AGA GAG TTC GCT ATG AAG CAT	1197
Thr Val Pro Arg Tyr Thr Cys Gln Arg Glu Phe Ala Met Lys His	
365 370 375	
TTG CCT GAA GAT CCA CTG TTT CAA CTG GTT TCA AAA CTC TAC GAA	1242
Leu Pro Glu Asp Pro Leu Phe Gln Leu Val Ser Lys Leu Tyr Glu	
380 385 390	
GTT TTC CTC CTG TTC TTA CAG AAC TTG GCA AAG TTA AAA CCT TGG	1287
Val Phe Leu Leu Phe Leu Gln Asn Leu Ala Lys Leu Lys Pro Trp	
395 400 405	
CCA AAT GTT GAT GCC CAC AGT GGT GTG TTG TTG AAC TAT TAT GGT	1332
Pro Asn Val Asp Ala His Ser Gly Val Leu Leu Asn Tyr Tyr Gly	
410 415 420	
TTA ACT GAA GCA AGA TAT TAT ACG GTC CTC TTT GGC GTA TCA AGA	1377
Leu Thr Glu Ala Arg Tyr Tyr Thr Val Leu Phe Gly Val Ser Arg	
425 430 435	
GCT CTT GGC ATT TGC TCT CAG CTA ATT TGG GAC CGA GCT CTT GGA	1422
Ala Leu Gly Ile Cys Ser Gln Leu Ile Trp Asp Arg Ala Leu Gly	
440 445 450	
TTG CCG CTA GAG AGG CCA AAG AGT GTC ACA ATG GAG TGG CTT GAG	1467
Leu Pro Leu Glu Arg Pro Lys Ser Val Thr Met Glu Trp Leu Glu	
455 460 465	
AAC CAG TGC AAG AAA GCA TGAATTGTTT GAAATCTCGC GAGCATAAAA	1515
Asn Gln Cys Lys Lys Ala	
470	
CACAATGTAT AATCTCTATG AATAATTGCT TGACAAAGCA CTCCTTTCTT	1565

GGGGGACAAG ATAGGTCGGC CCTTCAATGG GTTAACGAAC TTCAGTTCAA	1615
ACTTCACTGA ATTTGTGTGA ATTGTATGGT TTCTCGAGAC TTGTCCTGAA	1665
TTTTGAACTT AGTCTAGTGG ATTCATTTTT CTTCATTCCG AATTCCTCAC	1715
ACGCTGATCC AGCATGTAAA AATTAATAGG TCAATGCTAT TAATCGCGTT	1765
CTTGGTTGCC ATTAGACTTG TGAATGACTT CCTTTGCTGG AAAGTTAGTA	1815
ATCGGCTGAT TCACGCAATA AACTGCAATT GTGTAGTTTC TTAAATTGTC	1865
TAATTCTTAT <u>TTGATGATAT</u> TATGAA 1891	

SEQ ID NO.: 2
 ART DER SEQUENZ: Nukleotid mit entsprechendem Protein
 SEQUENZLÄNGE: 1551 Basenpaare

STRANGFORM: Einzelstrang
 TOPOLOGIE: linear
 ART DES MOLEKÜLS: cDNA

URSPRÜNGLICHE HERKUNFT

ORGANISMUS: Beta vulgaris L.
 HERKUNFT: cDNA-Bibliothek im Plasmid pBluescriptSK
 MERKMALE: von Nukleotid 1-1313 kodierende Region

EIGENSCHAFTEN: Citrat-Synthase (E.C. 4.1.3.7.)

TCC	TCT	AAC	CTT	GAC	CTT	CGT	TCA	GAG	TTA	CAA	GAA	CTG	ATT	CCT	45
Ser	Ser	Asn	Leu	Asp	Leu	Arg	Ser	Glu	Leu	Gln	Glu	Leu	Ile	Pro	
1				5					10					15	
GAA	CAA	CAG	GAA	CGA	CTG	AAG	AAG	ATA	AAG	AAA	GAA	TTT	GGA	AGT	90
Glu	Gln	Gln	Glu	Arg	Leu	Lys	Lys	Ile	Lys	Lys	Glu	Phe	Gly	Ser	
				20					25					30	
TTC	CAG	CTG	GGG	AAT	ATC	AAT	GTT	GAC	ATG	GTA	TTG	GGC	GGA	ATG	135
Phe	Gln	Leu	Gly	Asn	Ile	Asn	Val	Asp	Met	Val	Leu	Gly	Gly	Met	
				35					40					45	
AGA	GGA	ATG	ACT	GGT	TTA	CTT	TGG	GAG	ACT	TCC	TTA	CTC	GAC	CCA	180
Arg	Gly	Met	Thr	Gly	Leu	Leu	Trp	Glu	Thr	Ser	Leu	Leu	Asp	Pro	
				50					55					60	
JAA	GAG	GGT	ATC	CGG	TTC	AGG	GGT	TTT	TCT	ATA	CCT	GAA	TGC	CAG	225
Glu	Glu	Gly	Ile	Arg	Phe	Arg	Gly	Phe	Ser	Ile	Pro	Glu	Cys	Gln	
				65					70					75	
AAA	CTT	TTA	CCC	GCT	GCA	AGT	GCT	GGT	GCA	GAG	CCA	TTG	CCT	GAA	270
Lys	Leu	Leu	Pro	Ala	Ala	Ser	Ala	Gly	Ala	Glu	Pro	Leu	Pro	Glu	
				80					85					90	
GGT	CTT	CTT	TGG	CTT	CTT	TTA	ACC	GGA	AAG	GTT	CCT	AGC	AAA	GAG	315
Gly	Leu	Leu	Trp	Leu	Leu	Leu	Thr	Gly	Lys	Val	Pro	Ser	Lys	Glu	
				95					100					105	
CAA	GTA	GAT	GCT	CTA	TCA	GCA	GAT	TTA	CGA	AAA	CGT	GCT	TCT	ATC	360
Gln	Val	Asp	Ala	Leu	Ser	Ala	Asp	Leu	Arg	Lys	Arg	Ala	Ser	Ile	
				110					115					120	
CCA	GAC	CAT	GTG	TAC	AAA	ACA	ATT	GAT	GCT	CTA	CCT	ATT	ACG	GCT	405
Pro	Asp	His	Val	Tyr	Lys	Thr	Ile	Asp	Ala	Leu	Pro	Ile	Thr	Ala	
				125					130					135	

CAT	CCA	ATG	ACT	CAG	TTT	TGC	ACT	GGT	GTT	ATG	GCC	TTA	CAG	ACT	450
His	Pro	Met	Thr	Gln	Phe	Cys	Thr	Gly	Val	Met	Ala	Leu	Gln	Thr	140
				140					145					150	
CGA	AGC	GAA	TTT	CAG	AAG	GCA	TAT	GAG	AAA	GGG	ATC	CAT	AAG	TCA	495
Arg	Ser	Glu	Phe	Gln	Lys	Ala	Tyr	Glu	Lys	Gly	Ile	His	Lys	Ser	155
				155					160					165	
AAG	TTT	TGG	GAG	CCA	ACA	TAT	GAG	GAC	TGC	CTT	AGT	TTG	ATT	GCT	540
Lys	Phe	Trp	Glu	Pro	Thr	Tyr	Glu	Asp	Cys	Leu	Ser	Leu	Ile	Ala	170
				170					175					180	
CAA	GTT	CCT	GTT	GTT	GCA	GCT	TAT	GTT	TAT	CGG	AGG	ATG	TAT	AAG	585
Gln	Val	Pro	Val	Val	Ala	Ala	Tyr	Val	Tyr	Arg	Arg	Met	Tyr	Lys	185
				185					190					195	
AAT	GGA	CAA	GTA	ATA	CCG	CTG	GAT	GAC	TCC	CTT	GAT	TAT	GGT	GGA	630
Asn	Gly	Gln	Val	Ile	Pro	Leu	Asp	Asp	Ser	Leu	Asp	Tyr	Gly	Gly	200
				200					205					210	
AAT	TTC	GCA	CAC	ATG	TTG	GGA	TTT	GAT	AGC	CCT	CAG	ATG	CTT	GAG	675
Asn	Phe	Ala	His	Met	Leu	Gly	Phe	Asp	Ser	Pro	Gln	Met	Leu	Glu	215
				215					220					225	
CTG	ATG	CGC	CTT	TAT	GTC	ACA	ATT	CAC	AGT	GAT	CAT	GAG	GGT	GGA	720
Leu	Met	Arg	Leu	Tyr	Val	Thr	Ile	His	Ser	Asp	His	Glu	Gly	Gly	230
				230					235					240	
AAT	GTT	AGT	GCA	CAC	ACT	GGC	CAT	TTG	GTG	GGT	AGT	CCA	CTT	TCA	765
Asn	Val	Ser	Ala	His	Thr	Gly	His	Leu	Val	Gly	Ser	Pro	Leu	Ser	245
				245					250					255	
GAT	CCT	TAT	TTG	TCA	TTT	GCA	GCA	GCA	TTA	AAT	GGT	TTG	GCT	GGG	810
Asp	Pro	Tyr	Leu	Ser	Phe	Ala	Ala	Ala	Leu	Asn	Gly	Leu	Ala	Gly	260
				260					265					270	
CCA	CTC	CAT	GGA	TTA	GCC	AAC	CAG	GAA	GTC	CTG	CTG	TGG	ATT	AAA	855
Pro	Leu	His	Gly	Leu	Ala	Asn	Gln	Glu	Val	Leu	Leu	Trp	Ile	Lys	275
				275					280					285	
TCA	GTT	GTT	GAT	GAA	TGT	GGA	GAG	AAC	ATC	TCG	ACA	GAG	CAG	TTG	900
Ser	Val	Val	Asp	Glu	Cys	Gly	Glu	Asn	Ile	Ser	Thr	Glu	Gln	Leu	290
				290					295					300	
AAA	GAT	TAT	GTT	TGG	AAG	ACA	CTA	AAC	AGT	GGC	AAG	GTT	GTA	CCT	945
Lys	Asp	Tyr	Val	Trp	Lys	Thr	Leu	Asn	Ser	Gly	Lys	Val	Val	Pro	305
				305					310					315	
GGA	TTT	GGT	CTA	GGA	GTA	TTG	CGG	AAG	ACA	GAT	CCA	AGA	TAC	ACA	990
Gly	Phe	Gly	Leu	Gly	Val	Leu	Arg	Lys	Thr	Asp	Pro	Arg	Tyr	Thr	320
				320					325					330	
TGC	CAA	AGA	GAA	TTT	GCG	TTG	AAG	CAC	TTG	CCT	GAT	GAC	CCA	TTT	1035
Cys	Gln	Arg	Glu	Phe	Ala	Leu	Lys	His	Leu	Pro	Asp	Asp	Pro	Phe	335
				335					340					345	

TTT CAA TTG GTG TCA AAG TTG TAT GAA GTG GTG CCT CCT ATT CTA	1080
Phe Gln Leu Val Ser Lys Leu Tyr Glu Val Val Pro Pro Ile Leu	
350 355 360	
TTA GAG CTT GGA AAG GTA AAG AAT CCA TGG CCT AAT GTT GAT GCT	1125
Leu Glu Leu Gly Lys Val Lys Asn Pro Trp Pro Asn Val Asp Ala	
365 370 375	
CAT AGT GGA GTT TTG CTG AAC CAC TAT GGT TTG ACA GAA GCA AGA	1170
His Ser Gly Val Leu Leu Asn His Tyr Gly Leu Thr Glu Ala Arg	
380 385 390	
TAC TAT ACG GTT TTG TTT GGG GTA TCA AGG AGT CTT GGA ATA TGC	1215
Tyr Tyr Thr Val Leu Phe Gly Val Ser Arg Ser Leu Gly Ile Cys	
395 400 405	
TCA CAG CTT ATA TGG GAC CGA GCT CTT GGC TTG CCG CTA GAG AGG	1260
Ser Gln Leu Ile Trp Asp Arg Ala Leu Gly Leu Pro Leu Glu Arg	
410 415 420	
CCA AAG AGT GTC ACT ATG GAA TGG CTT GAA AAG TTT TGT AAA AGA	1305
Pro Lys Ser Val Thr Met Glu Trp Leu Glu Lys Phe Cys Lys Arg	
425 430 435	
AGA GCA TAACATTGAT GACATATCAA CTCACTGTTG TTCTTTGTCTG	1351
Arg Ala	
AATCTACAAT AATATAGTTT GAGGGACAAG AAAGAATTTT ATTTTCGGAG	1401
ATGAGATAAG CGAGGACTCA GAAACATAGT TTTCTTTGTC TCTTGCTGAG	1451
GTTTGCCTTT TATATATTTT ACTTGTAAT ATATTGTATG GTTTCTTGAT	1501
CAAAACATGA GATAAAGAGT TTTCATAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA	1551

SEQ ID NO.: 3
 ART DER SEQUENZ: Nukleotid mit entsprechendem Protein
 SEQUENZLÄNGE: 1747 Basenpaare

STRANGFORM: Einzelstrang
 TOPOLOGIE: linear
 ART DES MOLEKÜLS: cDNA

URSPRÜNGLICHE HERKUNFT

ORGANISMUS: *Nicotiana tabacum*
 HERKUNFT: cDNA-Bibliothek im Plasmid pBluescriptSK
 MERKMALE: — von Nukleotid 70-1476 kodierende Region

EIGENSCHAFTEN: Citrat-Synthase (E.C. 4.1.3.7.)

GCTCTTGGA TCTATTTCTCTCTCTATTT CTCCTAGGT AAAAGTTAAT 50

TTGTTGATTT TTGCGAGCC 69

ATG	GTG	TTC	TAT	CGC	GGC	GTT	TCT	CTG	CTG	TCA	AAG	CTG	CGT	TCT	114
Met	Val	Phe	Tyr	Arg	Gly	Val	Ser	Leu	Leu	Ser	Lys	Leu	Arg	Ser	
1				5				10						15	

CGA	GCG	GTC	CAA	CAG	ACA	AAT	CTT	AGC	AAC	TCT	GTG	CGG	TGG	CTT	159
Arg	Ala	Val	Gln	Gln	Thr	Asn	Leu	Ser	Asn	Ser	Val	Arg	Trp	Leu	
				20					25					30	

CAA	GTC	CAA	ACC	TCT	TCT	GGT	CTT	GAT	CTG	CGT	TCT	GAG	CTG	CAA	204
Gln	Val	Gln	Thr	Ser	Ser	Gly	Leu	Asp	Leu	Arg	Ser	Glu	Leu	Gln	
				35					40					45	

GAA	TTG	ATT	CCA	GAA	CAA	CAG	GAT	CGC	CTA	AAG	AAG	CTC	AAG	TCA	249
Glu	Leu	Ile	Pro	Glu	Gln	Gln	Asp	Arg	Leu	Lys	Lys	Leu	Lys	Ser	
				50					55					60	

GAG	CAT	GGA	AAG	GTT	CAA	TTG	GGA	AAC	ATC	ACA	GTT	GAT	ATG	GTT	294
Glu	His	Gly	Lys	Val	Gln	Leu	Gly	Asn	Ile	Thr	Val	Asp	Met	Val	
				65					70					75	

CTT	GGT	GGA	ATG	AGA	GGA	ATG	ACA	GGA	TTA	CTG	TGG	GAA	ACC	TCA	339
Leu	Gly	Gly	Met	Arg	Gly	Met	Thr	Gly	Leu	Leu	Trp	Glu	Thr	Ser	
				80					85					90	

TTA	CTT	GAC	CCC	GAT	GAA	GGA	ATT	CGC	TTT	CGG	GGC	TTG	TCT	ATC	384
Leu	Leu	Asp	Pro	Asp	Glu	Gly	Ile	Arg	Phe	Arg	Gly	Leu	Ser	Ile	
				95					100					105	

TAT	GAA	TGC	CAA	AAG	GTA	TTA	CCT	GCA	GCA	AAG	CCT	GGG	GGA	GAG	429
Tyr	Glu	Cys	Gln	Lys	Val	Leu	Pro	Ala	Ala	Lys	Pro	Gly	Gly	Glu	
				110					115					120	
CCC	TTG	CCT	GAA	GGT	CTT	CTC	TGG	CTT	CTT	TTA	ACA	GGA	AAG	GTG	474
Pro	Leu	Pro	Glu	Gly	Leu	Leu	Trp	Leu	Leu	Leu	Thr	Gly	Lys	Val	
				125					130					135	
CCA	TCA	AAA	GAG	CAA	GTG	GAT	TCA	TTG	TCT	CAG	GAA	TTG	CGA	AGT	519
Pro	Ser	Lys	Glu	Gln	Val	Asp	Ser	Leu	Ser	Gln	Glu	Leu	Arg	Ser	
				140					145					150	
CGT	GCT	ACT	GTC	CCC	GAT	CAT	GTA	TAC	AAA	ACT	ATT	GAT	GCC	TTA	564
Arg	Ala	Thr	Val	Pro	Asp	His	Val	Tyr	Lys	Thr	Ile	Asp	Ala	Leu	
				155					160					165	
CCA	GTC	ACA	GGT	CAT	CCA	ATG	ACT	CAG	TTT	GCT	ACT	GGA	GTC	ATG	609
Pro	Val	Thr	Ala	His	Pro	Met	Thr	Gln	Phe	Ala	Thr	Gly	Val	Met	
				170					175					180	
GCT	CTT	CAG	GTT	CAA	AGT	GAA	TTT	CAA	AAG	GCA	TAT	GAG	AAA	GGG	654
Ala	Leu	Gln	Val	Gln	Ser	Glu	Phe	Gln	Lys	Ala	Tyr	Glu	Lys	Gly	
				185					190					195	
ATT	CAC	AAA	TCA	AAG	TTA	TGG	GAA	CCG	ACA	TAT	GAG	GAT	TCC	ATG	699
Ile	His	Lys	Ser	Lys	Leu	Trp	Glu	Pro	Thr	Tyr	Glu	Asp	Ser	Met	
				200					205					210	
AGT	TTG	ATT	GCT	CAA	GTT	CCA	CTT	GTT	GCT	GCT	TAT	GTT	TAT	CGC	744
Ser	Leu	Ile	Ala	Gln	Val	Pro	Leu	Val	Ala	Ala	Tyr	Val	Tyr	Arg	
				215					220					225	
AGG	ATG	TAC	AAG	AAC	GGC	AAC	ACT	ATA	CCT	AAG	GAT	GAC	TCA	CTG	789
Arg	Met	Tyr	Lys	Asn	Gly	Asn	Thr	Ile	Pro	Lys	Asp	Asp	Ser	Leu	
				230					235					240	
GAT	TAT	GGT	GCA	AAT	TTT	GCT	CAC	ATG	CTT	GGT	TTC	AGT	AGC	TCT	834
Asp	Tyr	Gly	Ala	Asn	Phe	Ala	His	Met	Leu	Gly	Phe	Ser	Ser	Ser	
				245					250					255	
GAC	ATG	CAT	GAG	CTT	ATG	AAG	CTC	TAT	GTC	ACG	ATA	CAC	AGT	GAT	879
Asp	Met	His	Glu	Leu	Met	Lys	Leu	Tyr	Val	Thr	Ile	His	Ser	Asp	
				260					265					270	
CAT	GAA	GGT	GGT	AAC	GTC	AGT	GCT	CAC	ACA	GGT	CAC	TTG	GTT	GCT	924
His	Glu	Gly	Gly	Asn	Val	Ser	Ala	His	Thr	Gly	His	Leu	Val	Ala	
				275					280					285	
AGT	GCT	TTG	TCA	GAC	CCT	TAC	CTC	TCC	TTC	GCT	GCT	GCT	TTG	AAT	969
Ser	Ala	Leu	Ser	Asp	Pro	Tyr	Leu	Ser	Phe	Ala	Ala	Ala	Leu	Asn	
				290					295					300	
GGT	TGG	TTA	GCT	GGA	CCA	CTT	CAT	GGT	TTA	GCC	AAT	CAG	GAA	GTT	1014
Gly	Leu	Ala	Gly	Pro	Leu	His	Gly	Leu	Ala	Asn	Gln	Glu	Val	Leu	
				305					310					315	

TTG CTA ATC AAA TCT GTT GTA GAG GAG TGT GGG GAG AAC ATT TCC	1059
Leu Trp Ile Lys Ser Val Val Glu Glu Cys Gly Glu Asn Ile Ser	320 325 330
AAA GAG CAG TTG AAA GAC TAC GCT TGG AAA ACA TTG AAA AGT GGC	1104
Lys Glu Gln Leu Lys Asp Tyr Ala Trp Lys Thr Leu Lys Ser Gly	335 340 345
AAG GTT GTC CCT GGT TTC GGA CAT GGA GTT CTG CGC AAG ACT GAT	1149
Lys Val Val Pro Gly Phe Gly His Gly Val Leu Arg Lys Thr Asp	350 355 360
CCA AGA TAC ACA TGC CAG AGA GAG TTC GCT TTG AAG CAT TTG CCT	1194
Pro Arg Tyr Thr Cys Gln Arg Glu Phe Ala Leu Lys His Leu Pro	365 370 375
GAA GAT CCA CTG TTT CAA CTG GTT GCA AAA CTC TAC GAA GTG TTC	1239
Glu Asp Pro Leu Phe Gln Leu Val Ala Lys Leu Tyr Glu Val Phe	380 385 390
CTC CAA TTC TTA CAG AAC TTG GCA AAG TTA AAC CCT TGG CCA AAT	1284
Leu Gln Phe Leu Gln Asn Leu Ala Lys Leu Asn Pro Trp Pro Asn	395 400 405
GTT GAT GCC CAC AGT GGT GTG TTG TTG AAC TAT TAT GGT TTA ACT	1329
Val Asp Ala His Ser Gly Val Leu Leu Asn Tyr Tyr Gly Leu Thr	410 415 420
GAA GCA AGA TAT TAT ACG GTC CTC TTT GGT GTA TCA AGA GCT CTT	1374
Glu Ala Arg Tyr Tyr Thr Val Leu Phe Gly Val Ser Arg Ala Leu	425 430 435
GGC ATT TGC TCT CAG CTA ATT TGG GAC CGA GCT CTT GGA TTG CCA	1419
Gly Ile Cys Ser Gln Leu Ile Trp Asp Arg Ala Leu Gly Leu Pro	440 445 450
CTA GAG AGG CCA AAG AGT GTC ACA ATG GAG TGG CTT GAG AAC CAT	1464
Leu Glu Arg Pro Lys Ser Val Thr Met Glu Trp Leu Glu Asn His	455 460 465
TGC AAG AAA GCA TGATTTGTTA AAAGCACAAT GTAAAATCTT TATGAATAAT	1516
Cys Lys Lys Ala	
TGCTTGAGAA AGCAGTTTTT TCTTGGAGCC AAGGTAGGTC GCATTAGGAT	1566
GTTTCATCGAT TGGCTTAGTA CGGTTTTGAA AGATTTTGGT TGTGTATTTT	1616
CAGTTTCGGT TTTAAAAATG TTATACCAAT ACCTTATCGA TATAAATTCA	1666
ATATGATTTCG ATTTTTTACT TTTGTTTGAA AAAAAAACA AAAAAAATAA	1716
AAAAAATAA AAAGC	1731

Patentansprüche

1. Verfahren zur Inhibierung der Blütenbildung in Pflanzen, dadurch gekennzeichnet, daß die Expression der Citrat-Synthase gehemmt wird.
2. Verfahren zur Inhibierung der Blütenbildung in Pflanzen gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Expression der Citrat-Synthase durch den Einsatz von anti-sense-DNA gehemmt wird.
3. Verfahren zur Inhibierung der Blütenbildung in Pflanzen, dadurch gekennzeichnet, daß
 - a) in das Genom einer Pflanzenzelle eine DNA stabil integriert wird, die komplementär zu einem in der Zelle vorhandenen Citrat-Synthasegen ist,
 - b) diese DNA durch Kombination mit geeigneten, die Transkription steuernden Elementen konstitutiv oder induziert exprimiert wird,
 - c) die Expression endogener Citratsynthase-Gene aufgrund eines anti-sense-Effektes gehemmt wird und
 - d) aus den transgenen Zellen Pflanzen regeneriert werden.
4. Verfahren zur Verbesserung der Speicherkapazität von Nutzpflanzen, dadurch gekennzeichnet, daß
 - a) in das Genom einer Pflanzenzelle DNA stabil integriert wird, die komplementär zu einem in der Zelle vorhandenen Citrat-Synthasegen ist,
 - b) diese DNA durch Kombination mit geeigneten, die Transkription steuernden Elementen konstitutiv oder induziert exprimiert wird,
 - c) die Expression der Citratsynthase aufgrund eines anti-sense-Effektes gehemmt wird und
 - d) aus den transgenen Zellen Pflanzen regeneriert werden.
5. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 2 bis 4, worin die verwendete anti-sense-DNA in sense-Orientierung eine Nukleotidsequenz umfaßt, die für ein Protein mit der unter Seq ID No. 1 oder Seq ID No. 2 oder Seq ID No. 3 angegebenen Aminosäuresequenz oder eines Teiles davon kodiert, wobei die verwendete kodierende Sequenz geeignet ist, um die Expression eines endogenen Citrat-Synthasegens zu inhibieren.

6. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 2 bis 4, worin die DNA in sense-Orientierung die unter Seq ID No. 1 oder Seq ID No. 2 oder Seq ID No. 3 angegebene Nukleotidsequenz oder einen Teil davon umfaßt oder Derivate davon, die durch Insertion, Deletion oder Substitution von dieser Sequenz abgeleitet sind, wobei diese Teile oder Derivate geeignet sind, um die Expression eines endogenen Citrat-Synthasegens zu inhibieren.

7. Verfahren zur Induktion der Blütenbildung in Pflanzen, dadurch gekennzeichnet, daß

- a) in das Genom einer Pflanzenzelle DNA stabil integriert wird, die homologen oder heterologen Ursprungs ist und die für ein Protein mit Citrat-Synthase-Aktivität kodiert,
- b) diese DNA durch Kombination mit geeigneten, die Transkription steuernden Elementen konstitutiv oder induziert exprimiert wird,
- c) es aufgrund dieser Expression zu einer Steigerung der Citrat-Synthaseaktivität in den transgenen Zellen kommt und
- d) aus den transgenen Zellen Pflanzen regeneriert werden.

8. Verfahren gemäß Anspruch 7, worin die für eine Citrat-Synthase-Aktivität kodierende DNA-Sequenz eine Nukleotidsequenz umfaßt, die für ein Protein mit der unter Seq ID No. 1 oder Seq ID No. 2 oder Seq ID No. 3 angegebenen Aminosäuresequenz kodiert oder für einen Teil dieser Sequenzen, wobei diese Teile Citrat-Synthaseaktivität aufweisen.

9. Verfahren gemäß Anspruch 7, worin die für eine Citrat-Synthase-Aktivität kodierende DNA-Sequenz die unter Seq ID No. 1 oder Seq ID No. 2 oder Seq ID No. 3 angegebene Nukleotidsequenz oder einen Teil davon umfaßt, wobei dieser Teil lang genug ist, um für ein Protein zu kodieren, das Citrat-Synthase-Aktivität aufweist.

10. DNA-Sequenzen aus einer Pflanze der Familie der Solanaceae oder der Familie der Chenopodiaceae, die die kodierende Region für eine Citrat-Synthase (EC-Nr. 4.1.3.7.) enthalten, dadurch gekennzeichnet, daß die in der Nukleotidabfolge enthaltene Information bei Integration in ein pflanzliches Genom die Bildung von Transkripten erlaubt, durch die eine endogene Citrat-Synthaseaktivität unterdrückt

werden kann, oder die Bildung von Transkripten erlaubt, durch die die Citrat-Synthaseaktivität in den Zellen erhöht werden kann.

11. DNA-Sequenzen gemäß Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß diese Sequenzen aus der Spezies *Solanum tuberosum* stammen.

12. DNA-Sequenzen gemäß Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß diese Sequenzen aus der Spezies *Nicotiana tabacum* stammen.

13. DNA-Sequenzen gemäß Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß diese Sequenzen aus der Spezies Zuckerrübe stammen.

14. Eine DNA-Sequenz gemäß den Ansprüchen 10 und 11, dadurch gekennzeichnet, daß diese Sequenz die unter Seq ID No. 1 angegebene Nukleotidabfolge hat.

15. Eine DNA-Sequenz gemäß den Ansprüchen 10 und 12, dadurch gekennzeichnet, daß diese Sequenz die unter Seq ID No. 3 angegebene Nukleotidabfolge hat.

16. Eine DNA-Sequenz gemäß den Ansprüchen 10 und 13, dadurch gekennzeichnet, daß diese Sequenz die unter Seq ID No. 2 angegebene Nukleotidabfolge hat.

17. Ein Plasmid, dadurch gekennzeichnet, daß es DNA-Sequenzen gemäß einem oder mehreren der Ansprüchen 10 bis 16 enthält.

18. Plasmid pPCS, das unter der DSM-Nr. 8879 hinterlegt wurde.

19. Plasmid pKS-CSa, das unter der DSM-Nr. 8880 hinterlegt wurde.

20. Plasmid pSBCS, das unter der DSM-Nr. 9358 hinterlegt wurde.

21. Plasmid pTCS, das unter der DSM-Nr. 9357 hinterlegt wurde.

22. Plasmid TCSAS, das unter der DSM-Nr. 9359 hinterlegt wurde.

23. Die Verwendung der Plasmide gemäß den Ansprüchen 18 bis 22 oder Derivate oder Teile davon zur Transformation pro- und eukaryontischer Zellen.
24. Bakterien, enthaltend DNA-Sequenzen gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 10 bis 16.
25. Bakterien enthaltend Plasmide gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 18 bis 22.
26. Transgene Pflanzen, enthaltend DNA-Sequenzen gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 10 bis 16 als Bestandteil rekombinanter DNA.
27. Transgene Pflanze gemäß Anspruch 26 dadurch gekennzeichnet, daß ihre Citrat-Synthaseaktivität durch Anwesenheit einer DNA-Sequenz gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 10 bis 16, die Bestandteil einer rekombinanten DNA ist, verändert ist.
28. Transgene Pflanze gemäß Anspruch 26 oder 27, dadurch gekennzeichnet, daß es eine Nutzpflanze ist.
29. Transgene Pflanze gemäß Anspruch 26 oder 27, dadurch gekennzeichnet, daß es eine Kartoffel ist.
30. Verwendung von DNA-Sequenzen aus Pflanzen, die für eine Citrat-Synthase (EC-Nr. 4.1.3.7.) kodieren, zur Inhibierung der Blütenbildung in Pflanzen.
31. Verwendung einer DNA-Sequenz gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 10 bis 16 in Kombination mit Steuerelementen für eine Expression in pro- und eukaryontischen Zellen.
32. Verwendung einer DNA-Sequenz gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 10 bis 16 zur Expression einer nicht translatierbaren mRNA, die die Synthese einer endogenen Citrat-Synthase in den Zellen verhindert.
33. Verwendung der DNA-Sequenzen gemäß den Ansprüchen 14, 15 oder 16 zur Isolierung homologer Sequenzen aus dem Genom von Pflanzen.

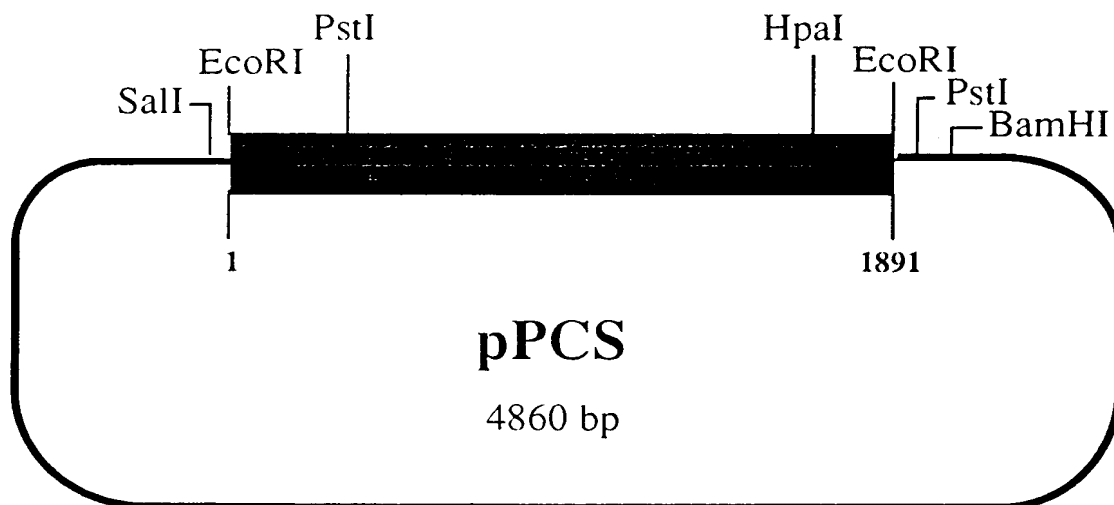


Fig. 1

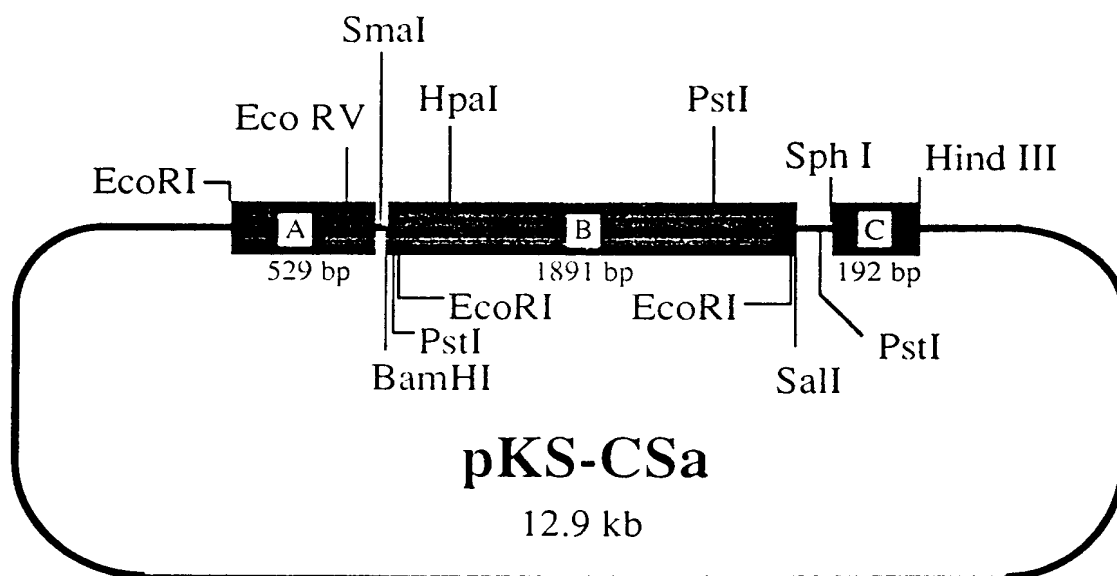


Fig. 2

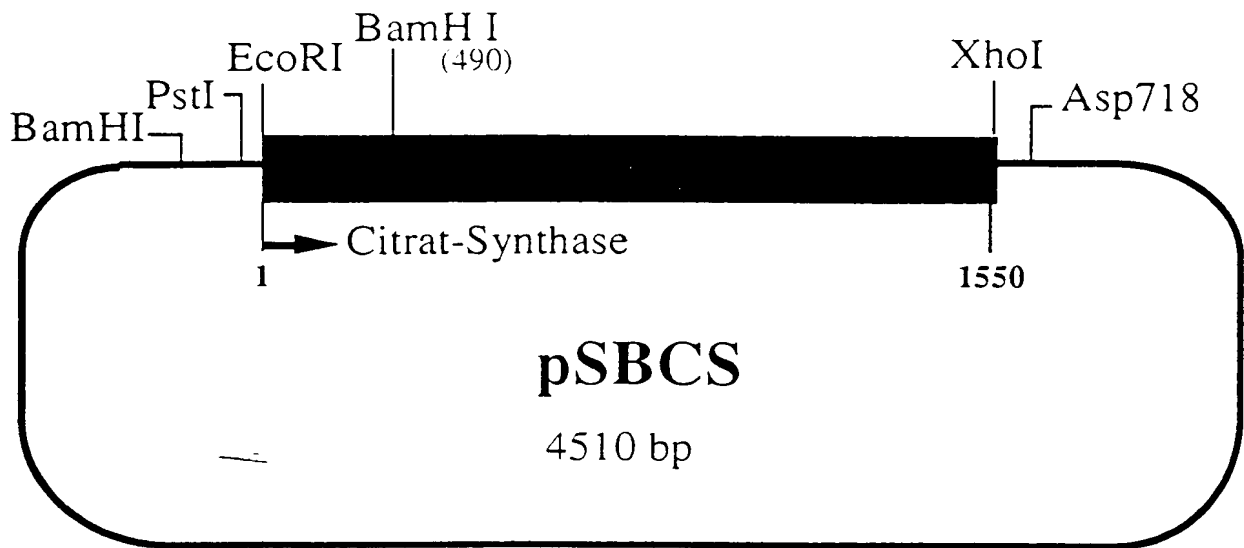


Fig. 3

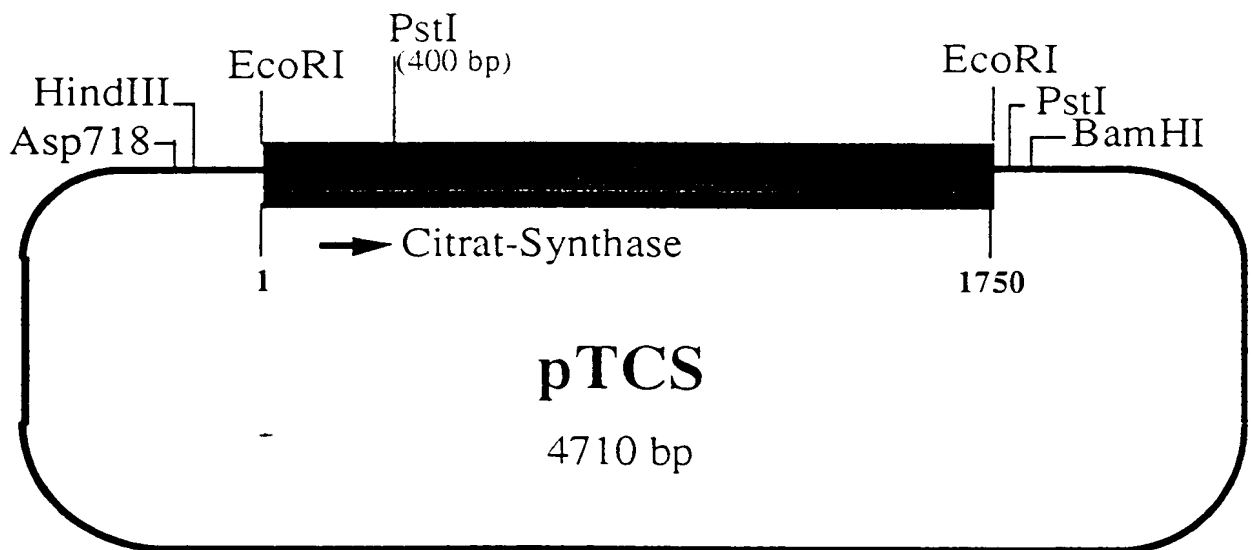


Fig. 4

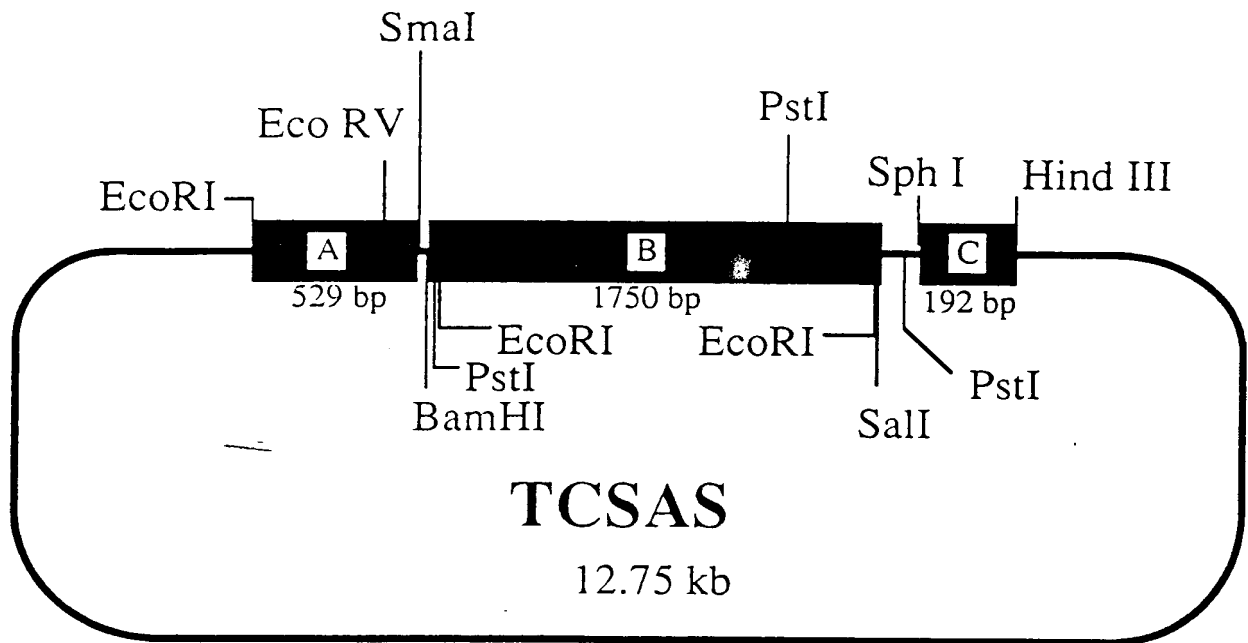


Fig. 5

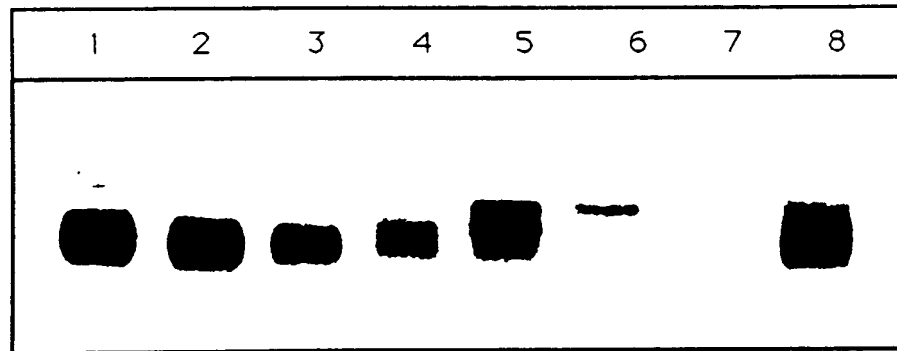


Fig. 6

Citratsynthase-Aktivität (in nmol/min/mg Protein) in
verschiedenen Organen der Pflanzen und in
Mitochondrien

	Wildtyp	T55	T50	T6	T29
Blätter	55.6± 25.0	32.7± 25.0	15.1± 8.7	15.0± 7.7	3.2± 1.2
	100%	58.8%	27.1%	27.0%	5.8%
Knollen	8.5± 3.4	4.9± 0.8	1.1± 0.3	1.6± 0.5	2.0± 0.8
	100%	57.6%	12.9%	18.8%	23.5%
Mitochondrien	1788± 492	450± 120	265± 45	260± 50	193± 118
	100%	25.2%	14.8%	14.5%	9.3%

Wildtyp= *Solanum tuberosum* cv. Désirée,
T55, T50, T6, T29= unabhängige, transgene Kartoffellinien

Fig. 7

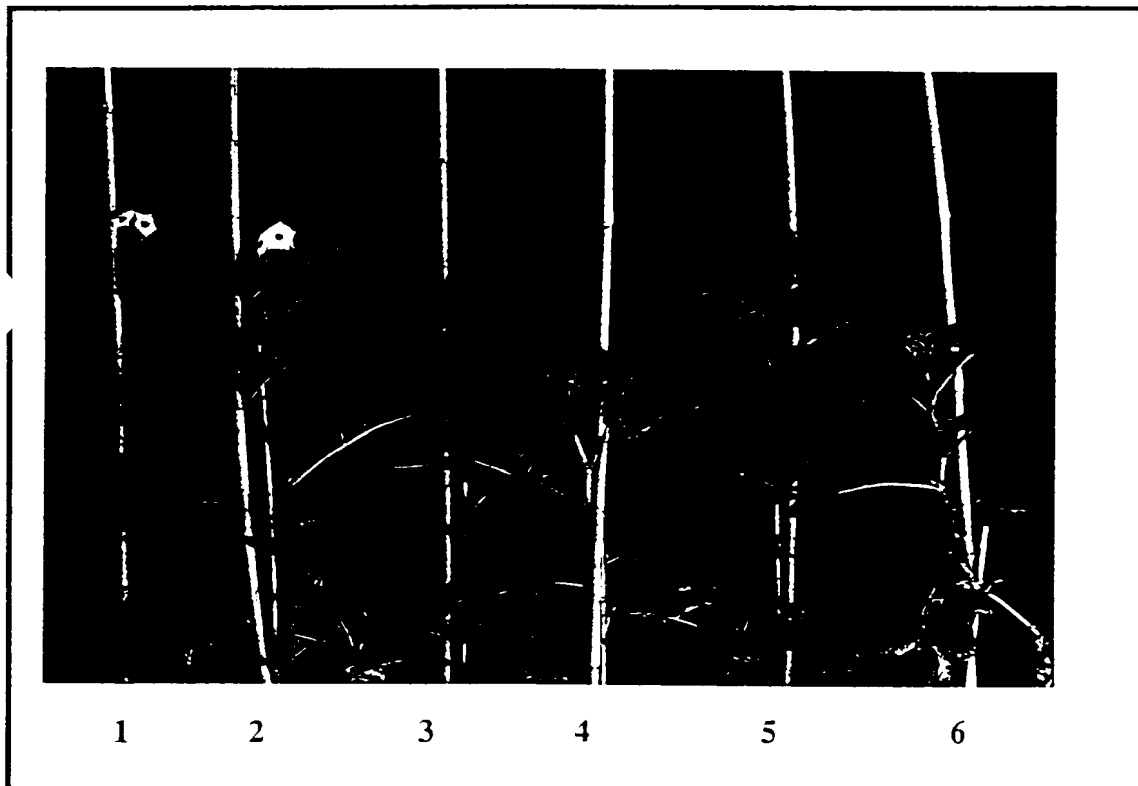


Fig. 8

Zusammenfassung

Es wird ein Verfahren zur Inhibierung der Blütenbildung bei Pflanzen, sowie ein Verfahren zur Verbesserung der Speicherkapazität von Nutzpflanzen beschrieben.

Desweiteren werden DNA-Sequenzen, die bei Integration in ein pflanzliches Genom die Aktivität der Citrat-Synthase der Pflanze verändern, Plasmide, die diese DNA-Sequenzen enthalten, sowie transgene Pflanzen, bei denen durch Einführung der DNA-Sequenzen Veränderungen der Aktivität der Citrat-Synthase hervorgerufen werden, beschrieben.

Bei den beschriebenen DNA-Sequenzen handelt es sich um Sequenzen aus *Solanum tuberosum*, *Nicotiana tabacum* und *Beta vulgaris*, die für das Enzym Citrat-Synthase kodieren.

Die Erfindung beschreibt weiterhin transgene Kartoffelpflanzen, bei denen es aufgrund einer Inhibierung der Citrat-Synthaseaktivität zu einer Inhibierung der Blütenbildung, einer Verringerung der Lagerungsverluste der Knollen sowie einer Veränderung des Sprossungsverhaltens kommt.

